

**Elektrophysiologische Untersuchung
des gerichteten Protonentransportes in
mikrobiellen Rhodopsinen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik
eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biochemiker Arend Vogt

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Prof. Dr. Franz Bartl
3. Prof. Dr. Thomas Friedrich

Eingereicht am: 08.11.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2017

Zitat

Auf die Frage, wie hoch die Schallgeschwindigkeit sei:

Weiß ich nicht.

Ich beschwere mein Gedächtnis nicht mit Tatsachen,
die ich in meinem Konversationslexikon finden kann.

Albert Einstein

Abstract

Microbial rhodopsins are found in all kingdoms of life. They are light-sensitive membrane proteins and function as sensors, enzymes or ion-translocators. The ion transporters are subdivided into light-driven ion pumps and light-gated channels. Biophysical research has put focus on the proton pump bacteriorhodopsin for long time. Consequently, bacteriorhodopsin is the most prominent representative of microbial rhodopsins, especially of the light-driven ion pumps. The remarkable feature of light-driven pumps is their ability to utilize light energy for active transport of ions across membranes. They convert light energy into an electrochemical potential.

Despite the fact that light-driven proton pumps are investigated for over 40 years, the knowledge about their electrophysiological properties is surprisingly low. For this reason, this thesis is devoted to the electrophysiological characterization of microbial rhodopsins with special focus on light-driven proton pumps. For this purpose, "Two-Electrode Voltage Clamp"-recordings (TEVC) were primarily performed using oocytes from African clawed frog *Xenopus laevis*.

The investigation of diverse proton pumps has shown that the differences in their electrophysiological behaviors are unexpectedly high. Special interest was laid on proton pumps which show passive inward directed photocurrents when the electrochemical load exceeds a certain level. The dualism of pump and channel activity was particularly pronounced in the proton pump *Gloeobacter*-rhodopsin. Other proton pumps, for instance bacteriorhodopsin or *Coccomyxa*-rhodopsin, do not show inward directed photocurrents. Due to high photocurrent amplitudes, the *Coccomyxa*-rhodopsin was selected for an efficient mutagenesis study. This study allowed the identification of structural key determinants for the differences among proton pumps themselves and for the differences of proton pumps in comparison with light-gated ion channels (channelrhodopsins). Therefore, the counter-ion-complex and residues in direct proximity are fundamental for active transport because mutations in this region cause inactive or purely passive transporters. The extracellular half-channel is the key element in proton pumps which prevents passive proton-backflow during the pump-cycle. Mutations in this region lead to passive leak-currents in overlap with the remaining pump-activity. In contrast, the intracellular half-channel of microbial rhodopsins is of subordinate importance for the differences between active and passive transport.

The diversity of light-driven proton pumps is explained by the theory that a passive conducting state exists during the pump-cycle in all proton pumps. The key variability among the proton pumps is their different efficiency, caused by their dissimilar extracellular half-channels, to inactivate this passive conducting state at high electrochemical load. It is also postulated that this concept does apply to channelrhodopsins because channelrhodopsins exhibit tiny pump activity which is massively overlaid by non-inactivated passive ion conductance.

Zusammenfassung

Mikrobielle Rhodopsine sind in allen Domänen des Lebens vertreten. Sie übernehmen als lichtensitive Membranproteine Funktionen als Sensoren, Biokatalysatoren und Ionentransporter. Die Ionentransporter unterteilen sich in lichtgetriebene Ionenpumpen und in lichtaktivierte Kanalrhodopsine. Besonders die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin steht schon lange im Fokus biophysikalischer Untersuchungen. Daher ist Bakteriorhodopsin als eines der bekanntesten Rhodopsine auch zugleich der Hauptvertreter der lichtgetriebenen Ionenpumpen. Die bemerkenswerte Eigenschaft der Ionenpumpen ist es, dass sie Lichtenergie nutzen, um aktiv Ionen zu transportieren. Daher wandeln Ionenpumpen Lichtenergie in elektrochemische Energie um.

Obwohl die Protonenpumpen seit über 40 Jahren intensiv untersucht werden, ist das Wissen über deren elektrophysiologische Eigenschaften noch immer gering. Aus diesem Grund widmete sich diese Arbeit der elektrophysiologischen Charakterisierung der mikrobiellen Rhodopsine mit dem Fokus auf Protonenpumpen. Hierfür wurden vor allem „Two-Electrode Voltage Clamp“-Messungen (TEVC) an Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt.

Die Untersuchung verschiedener Protonenpumpen hat gezeigt, dass diese eine unerwartet große Diversität in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen. Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass einige Protonenpumpen neben Pumpströmen auch passive einwärts gerichtete Photoströme zeigten. Besonders deutlich war der „Pump-Kanal-Dualismus“ bei dem *Gloeobacter*-Rhodopsin ausgeprägt. Andere Protonenpumpen, wie das Bakteriorhodopsin oder *Coccomyxa*-Rhodopsin, zeigten keine einwärts gerichteten Photoströme. Das *Coccomyxa*-Rhodopsin wurde aufgrund seiner hohen Photostrom-Amplituden in Oozyten für eine Mutationsanalyse ausgewählt. Diese Mutationsanalyse verhalf die strukturellen Ursachen für die funktionalen Unterschiede zu identifizieren, welche sowohl zwischen den Protonenpumpen untereinander als auch gegenüber Kanalrhodopsinen beobachtet wurden. Demnach sind der Gegenion-Komplex und die unmittelbar benachbarten Positionen elementar für aktiven Protonentransport in Protonenpumpen. Mutationen in dieser Region führen zu rein passiven oder inaktiven Transportern. Dagegen übernimmt der extrazelluläre Halbkanal in Protonenpumpe die Aufgabe einen passiven Protonen-Rückfluss während des Pumpzyklus zu verhindern, denn Mutationen in dieser Region verursachen passive Photoströme zusätzlich zum aktiven Pumpstrom. Der intrazelluläre Halbkanal spielt für die Verhinderung von passiven „leak-Ströme“ eine untergeordnete Rolle.

Die Diversität der Protonenpumpen wird durch die Theorie erklärt, dass zusätzlich zum aktiven Pumpzyklus ein passiv leitender Zustand gebildet werden kann. Der Unterschied zwischen den Pumpen liegt in der Ausprägung dieses passiv leitenden Zustandes bei verschiedenen elektrochemischen Bedingungen. Die Ursache hierfür sind die verschiedenen Strukturen des extrazellulären Halbkanals in den jeweiligen Protonenpumpen. Es wird postuliert, dass das Konzept aus einem Pumpzyklus mit einem zusätzlich passiv leitenden Zustandes in ähnlicher Form auch auf Kanalrhodopsine zutrifft. Diese zeigen einen schwachen Pumpstrom, der jedoch unter physiologischen Bedingungen von den viel größeren passiven Strömen überlagert wird.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgende wissenschaftliche Publikationen mit eingeflossen:

1. **Vogt, A.**, Guo, Y., Tsunoda, S.P., Kateriya, S., Elstner, M., and Hegemann, P. 2015. Conversion of a light-driven proton pump into a light-gated ion channel. *Scientific reports* 5: 16450. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16450>
2. **Vogt, A. ***, Wietek, J. *, and Hegemann, P. 2013. Gloeobacter rhodopsin, limitation of proton pumping at high electrochemical load. *Biophysical journal* 105(9): 2055-2063. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.08.031>
3. AzimiHashemi, N. *, Erbguth, K. *, **Vogt, A. ***, Riemensperger, T., Rauch, E., Woodmansee, D., Nagpal, J., Brauner, M., Sheves, M., Fiala, A., Kattner, L., Trauner, D., Hegemann, P., Gottschalk, A., and Liewald, J.F. 2015. Synthetic retinal analogs modify the spectral and kinetic characteristics of microbial rhodopsin optogenetic tools. *Nature communications* 6: 6458. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6810>
4. Wietek, J. *, Wiegert, J.S. *, Adeishvili, N., Schneider, F., Watanabe, H., Tsunoda, S.P., **Vogt, A.**, Elstner, M., Oertner, T.G., and Hegemann, P. 2014. Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel. *Science* 344(6182): 409-412. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1249375>
5. Ferenczi, E.A. *, Vierock, J. *, Atsuta-Tsunoda, K., Tsunoda, S.P., Ramakrishnan, C., Gorini, C., Thompson, K., Lee, S.Y., Berndt, A., Perry, C., Minniberger, S., **Vogt, A.**, Mattis, J., Prakash, R., Delp, S., Deisseroth, K., and Hegemann, P. 2016. Optogenetic approaches addressing extracellular modulation of neural excitability. *Scientific reports* 6: 23947. <http://dx.doi.org/10.1038/srep23947>

***equal contribution**

Inhaltsverzeichnis

Zitat.....	I
Abstract	II
Zusammenfassung.....	III
Publikationsliste	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	9
1.1 Mikrobielle Rhodopsine	9
1.2 Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin	10
1.2.1 Der Photozyklus der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin	10
1.2.2 Die Elektrophysiologie von Bakteriorhodopsin	13
1.2.3 Unterscheidung und Definition von aktiven und passiven Transport.....	15
1.3 Weitere Ionen-transportierende Rhodopsine.....	17
1.3.1 Lichtgetriebene Ionen-Pumpen.....	17
1.3.2 Protonenpumpen vom Proteorhodopsin-Typ.....	17
1.3.3 Lichtaktivierte Kanalrhodopsine.....	18
1.4 Anwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik.....	20
1.5 Modifizierung der Eigenschaften von mikrobiellen Rhodopsinen	21
1.6 Retinal und dessen Derivate als Cofaktor in Rhodopsinen	22
1.6.1 Grundlagen zu den Absorptionseigenschaften von Rhodopsinen	22
1.6.2 Modifikation der Absorptionseigenschaften durch Retinal-Analoga.....	23
1.7 Zielsetzung der Dissertation	25
2 Ergebnisse.....	26
2.1 Photoströme mikrobieller Rhodopsine in Oozyten.....	26
2.1.1 Photoströme der Ionenpumpen.....	26
2.1.2 Stromamplituden von mikrobiellen Rhodopsinen	35
2.1.3 Vergleich der Expression von ChR2 mit Ionenpumpen in Oozyten.....	36
2.1.4 Vergleich der Expression von ChR2 mit Ionenpumpen in HEK-Zellen.....	38
2.2 Untersuchung des <i>Gloeobacter</i> -Rhodopsins.....	41
2.2.1 Detailliertere Untersuchung von GR-WT.....	41
2.2.2 Struktur- und Mutationsanalyse von GR.....	43
2.2.3 Umkehrpotentiale der GR-Mutanten.....	48
2.2.4 Doppelpulsexperimente von GR-WT, GR-E132D, ESR-WT und CsR-WT	49
2.3 Untersuchung des <i>Coccomyxa</i> -Rhodopsins	51
2.3.1 CsR als Stellvertreter der Protonenpumpen vom BR-Typ	52

2.3.2	Intrazellulärer Halbkanal von CsR.....	53
2.3.3	Gegenion-Komplex und benachbarte Positionen in CsR.....	55
2.3.4	Extrazellulärer Halbkanal von CsR	58
2.3.5	Extrazelluläre Glutamate der Pumpen vom BR-Typ.....	60
2.3.6	Mutanten der Retinal-Bindetasche	61
2.3.7	E_{rev} der Mutanten des Gegenion-Komplexes und des extrazellulären Halbkanals	63
2.3.8	Kombination von CsR-R83Q mit zusätzlichen Mutationen	64
2.4	Sind die CsR-Mutationen auf andere Protonenpumpen übertragbar?.....	68
2.5	Kanalrhodopsine mit negativ verschobenen Umkehrpotentialen	71
2.5.1	Ein Kanalrhodopsin mit Pumpströmen: ChR1-T198M	71
2.5.2	Gating-Mutanten von ChR2.....	75
2.6	Untersuchung mikrobieller Rhodopsine mit Retinal Analoga	80
2.6.1	Strukturen und Absorptionsspektren der Retinal-Analoga.....	80
2.6.2	Photoströme von ChR2 und Arch-3 mit Retinal Analoga in HEK293-Zellen.....	82
3	Diskussion.....	86
3.1	Untersuchung des Pump-Kanal-Dualismus	86
3.1.1	Theoretische Überlegungen zum Pump-Kanal-Dualismus.....	86
3.1.2	Vergleich der experimentellen Daten mit den theoretischen Überlegungen.....	91
3.2	Vergleich von Pumpen mit Kanalrhodopsinen	95
3.2.1	Intrazellulärer Halbkanal von Protonenpumpen und Kanälen.....	95
3.2.2	Gegenion-Komplex und benachbarte Positionen bei Protonenpumpen und Kanälen	97
3.2.3	Extrazellulärer Halbkanal von Protonenpumpen und Kanälen	98
3.2.4	Der Extrazelluläre Halbkanal der Pumpen vom PR-Typ und die Mutante GR-S46D..	100
3.2.5	Bedeutung der Retinal-Bindetasche für den Ionentransport.....	102
3.3	Abschließende Betrachtung der Modelle.....	104
3.3.1	Erweiterung des „step by step“-Modells.....	104
3.3.2	Erklärung der passiven Protonenströme auf struktureller Ebene.....	106
3.4	Diversität der lichtgetriebenen Protonenpumpen.....	108
3.5	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick für die Rhodopsin-Forschung	110
4	Material und Methoden	112
4.1	Molekularbiologische Methoden	112
4.1.1	Gene und Standardvektoren	112
4.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	113
4.1.3	Klonierung, PCR, Restriktionsverdau und Ligation	113

4.1.4	Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmide.....	114
4.1.5	Ortsspezifische Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen	115
4.1.6	Synthese von RNA für die Injektion in Oozyten	115
4.1.7	Western Blotting von Membranfraktionen aus Oozyten.....	115
4.1.8	Kultivierung der Mikroalge <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169.....	116
4.2	„Two-Elektrode Voltage Clamp“- Messung an Oozyten.....	116
4.2.1	Präparation und Mikroinjektion der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	116
4.2.2	TEVC-Messungen an Oocyten	117
4.2.3	Messpuffer für die Experimente an Oozyten	119
4.2.4	Analyse und Auswertung der Daten.....	119
4.2.5	Laser-Messungen an Oozyten	119
4.3	Experimente mit HEK293-Zellen.....	120
4.3.1	Kultivierung und Transfektion der HEK293-Zellen	120
4.3.2	Serum-freie Kultivierung der HEK293-Zellen.....	120
4.3.3	„Patch-Clamp“- Messungen an HEK293-Zellen.....	120
5	Anhang.....	122
5.1	Bezugsquellen der Retinal-Analoga.....	122
5.2	Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen.....	122
5.3	Auflistung der Geräte	125
5.4	Abbildungsverzeichnis.....	126
5.5	Tabellenverzeichnis	128
5.6	Abkürzungen.....	129
6	Literaturverzeichnis.....	130
7	Konferenz- und Seminarbeiträge	139
8	Danksagung	140
9	Eigenständigkeitserklärung	141

1 Einleitung

1.1 Mikrobielle Rhodopsine

Die Proteine vom Rhodopsin-Typ lassen sich in allen Domänen des Lebens finden und begründen eine sehr umfangreiche Proteinklasse mit vielfältigen Funktionen. Daher spielt die Untersuchung der Rhodopsine eine zentrale Rolle in den Lebenswissenschaften. Die Erforschung der Rhodopsine in all ihren *Facetten* ist ein sich rasant entwickelndes Forschungsfeld, welches auch den Einzug in die angewandten Wissenschaften vollzogen hat. Allein während der Erstellung dieser schriftlichen Arbeit sind viele neue Entdeckungen, Erkenntnisse und Anwendungen hinzugekommen.

Als Rhodopsine werden integrale Membranproteine bezeichnet, welche den lichtsensitiven Cofaktor Retinal binden. Die Struktur der Rhodopsine besteht aus 7-Transmembran-Helices. Das Retinal ist kovalent als Schiff-Base an einem Lysin-Rest innerhalb des Proteins gebunden. Basierend auf der Aminosäure-Sequenz lassen sich die Rhodopsine in zwei Haupttypen unterscheiden [1]. Rhodopsine vom Typ-I wurden bisher nur in einzelligen Organismen gefunden und werden daher auch als mikrobielle Rhodopsine bezeichnet. Dagegen sind Rhodopsine vom Typ-II in mehrzelligen Organismen zu finden. Diese Arbeit untersuchte die electrophysiologischen Eigenschaften mikrobieller Rhodopsine, welche daher im Folgenden näher vorgestellt werden. Eine Übersicht der mikrobiellen Rhodopsine ist in Abbildung 1 gezeigt.

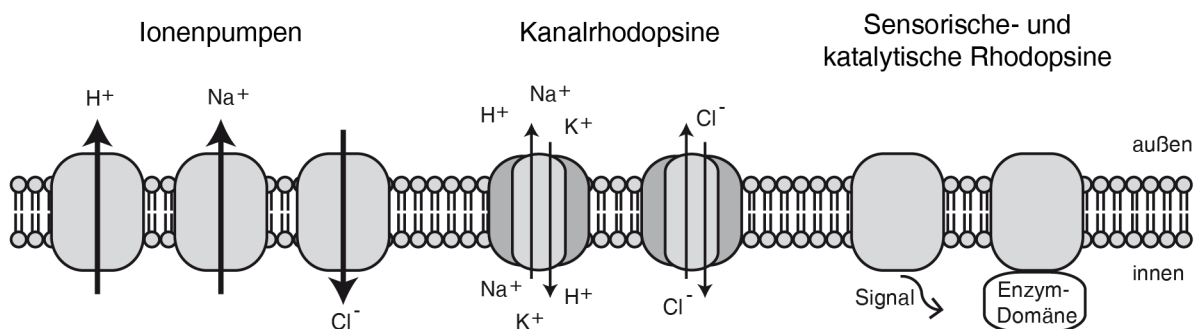


Abbildung 1: Die funktionale Vielfalt mikrobieller Rhodopsine. Die lichtgetriebenen Ionenpumpen können aktiv Ionen gegen einen elektrochemischen Gradienten transportieren. Lichtaktivierte Kanalrhodopsine ermöglichen den passiven Transport von Kationen oder Anionen. Des Weiteren sind sensorische und katalytische Rhodopsine bekannt, welche durch Interaktion mit weiteren Proteinen oder durch eigene enzymatische Domänen an Signalwegen beteiligt sind.

Mikrobielle Rhodopsine wurden bisher in Archaea, Bakterien, Algen und Pilzen gefunden. Basierend auf ihrer Funktionsweise lassen sich die mikrobiellen Rhodopsine weiter in sensorische Rhodopsine, Rhodopsine mit Enzymaktivität, Kanalrhodopsine und in Ionenpumpen einteilen. Die sensorischen Rhodopsine werden durch Licht aktiviert und interagieren mit weiteren Proteinen, um Signaltransduktionswege auszulösen. Enzymatische Rhodopsine tragen Enzym-Domänen, welche zum Beispiel eine lichtabhängige Guanylatzyklase-Aktivität ausüben [2, 3]. Von den Kanalrhodopsinen gibt es sowohl Kation- als auch Anion-Kanäle, welche in Abschnitt 1.3.3 näher beschrieben werden.

Die Ionenpumpen sind die am längsten bekannten Vertreter der mikrobiellen Rhodopsine. Das erste mikrobielle Rhodopsin wurde von D. Oesterhelt und W. Stoeckenius im Jahr 1971 entdeckt [4]. Hierbei handelte es sich um die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aus dem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum*. Alle bisher bekannten lichtgetriebenen Protonenpumpen transportieren

Protonen nur in eine Richtung und zwar vom intrazellulären in den extrazellulären Raum. Mit Hilfe des dadurch entstehenden Protonengradienten kann in einem Prozess, welcher als Photophosphorylation bezeichnet wird, ATP hergestellt werden [5]. Aufgrund der Bedeutung von Bakteriorhodopsin als Hauptvertreter der Protonenpumpen und auch der Ionenpumpen allgemein, wird dieses Protein in Abschnitt 1.2 detailliert beschrieben. Einen Überblick über die weiteren Ionenpumpen wird in Abschnitt 1.3 gegeben.

Allen mikrobiellen Rhodopsinen liegt der Mechanismus zugrunde, dass Lichtabsorption eine Konfigurationsänderung des Retinals auslöst und einen Photozyklus initiiert. Bei allen Ionen-transportierenden Rhodopsinen isomerisiert das Retinal von der *all-trans* Konfiguration zum *13-cis*-Retinal, wie in Abbildung 2 gezeigt. Hierfür muss kurzzeitig die π -Bindung zwischen dem C₁₃ und C₁₄ aufgelöst werden. Am Ende vom Photozyklus isomerisiert das *13-cis*-Retinal thermisch zurück in die *all-trans* Konfiguration. Auf weitere relevante Aspekte zum Cofaktor Retinal wird in Abschnitt 1.6 näher eingegangen.

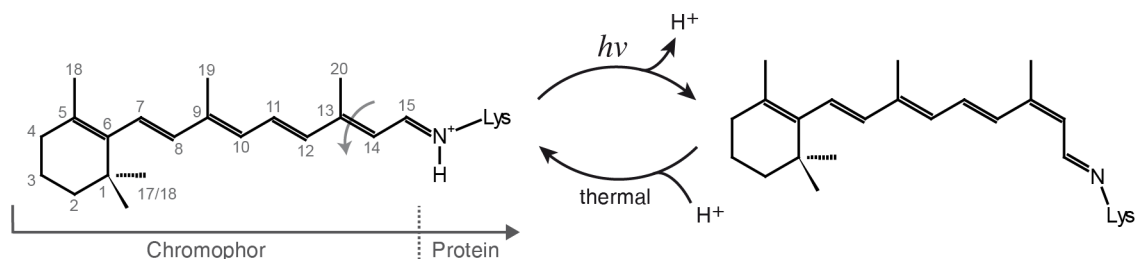


Abbildung 2: Isomerisierung des Retinals in Ionen-transportierenden Rhodopsinen. Gezeigt ist sowohl die lichtinduzierte Isomerisierung als auch die langsamere thermische Rück-Isomerisierung.

Mikrobielle Rhodopsine nehmen mittlerweile eine bedeutende Rolle in den Neurowissenschaften ein. So können Rhodopsine als „optogenetische Tools“ verwendet werden, um zum Beispiel gezielt Aktionspotentiale in Neuronen zu stimulieren (siehe Abschnitt 1.4). Die Entwicklung „optogenetischer Tools“ hat sich zu einer neuen angewandten Forschungsrichtung, der Optogenetik, entwickelt. Ohne die dafür notwendige Grundlagenforschung zu den mikrobiellen Rhodopsinen wäre diese Entwicklung undenkbar gewesen.

1.2 Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin

1.2.1 Der Photozyklus der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) nimmt als ein Modellprotein für Membranproteine eine besondere Rolle in der Wissenschaft ein. Viele Erkenntnisse und Methoden wurden mit Hilfe von BR entwickelt, wie zum Beispiel die Strukturaufklärung von Membranproteinen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie oder die Kristallisation in „*cubic-lipid-phases*“ [6-9].

Zum Verständnis der Funktionsweise von Bakteriorhodopsin auf molekularer Ebene dienten hauptsächlich zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen. Hierbei wurde festgestellt, dass Bakteriorhodopsin nach Lichtanregung einen Zyklus mit unterschiedlichen Photointermediaten durchläuft. Diese Photointermediate sind durch unterschiedliche Absorptionseigenschaften und unterschiedliche Kinetiken unterscheidbar.

Besonders mit der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) konnten einzelne Positionen innerhalb des Proteins identifiziert werden, welche während des Photozyklus protoniert bzw. deprotoniert werden. Basierend auf diesen spektroskopischen Untersuchungen hat sich ein Modell für den gerichteten Protonentransport für BR etabliert, welches in Abbildung 3 gezeigt ist. Dieses Modell und die nachfolgende Beschreibung orientieren sich an bereits existierenden Übersichtsartikeln [1, 10-12]. Für die dazugehörige sehr umfangreiche Primärliteratur sei auf diese Übersichtsarbeiten verwiesen, wobei die Arbeit von Sergei P. Balashov besonders detailliert ausgeführt ist [10]. Im Folgenden ist lediglich eine kurze Zusammenfassung gegeben.

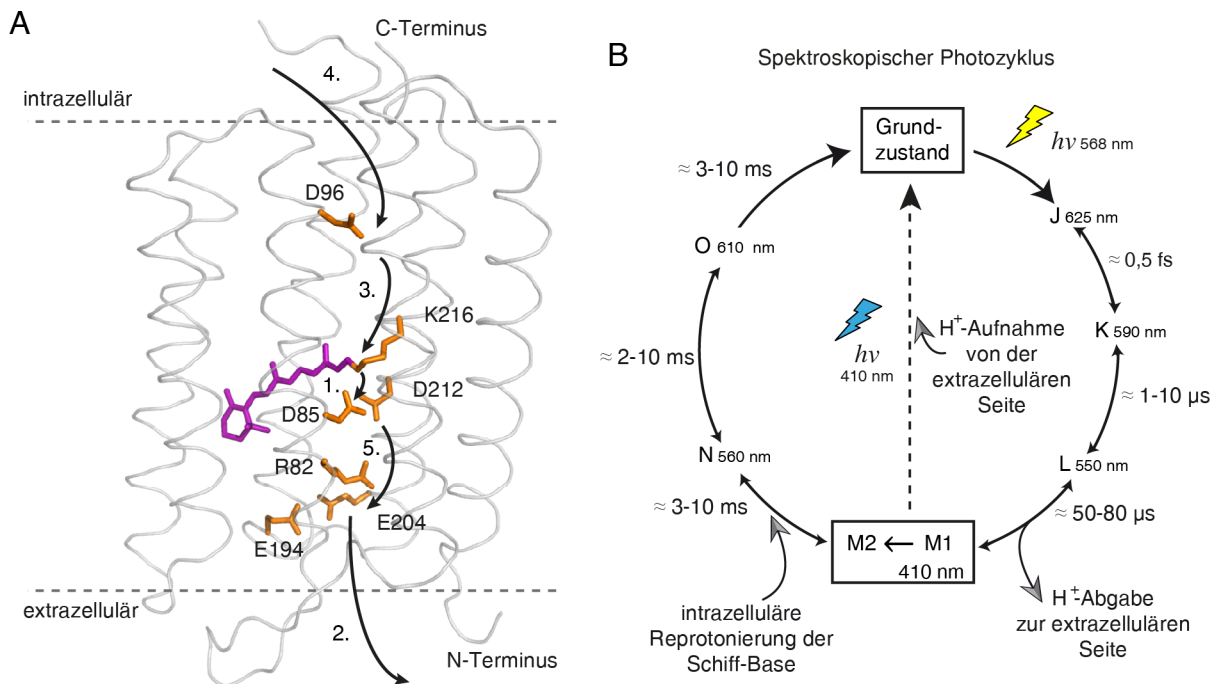


Abbildung 3: Der Protonentransport und der Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Weitere Details sind im Text erläutert. **A:** Kristallstruktur von BR (1C3W) von Luecke *et al.* [13]. Die Pfeile zeigen die einzelnen Protonentransferschritte. **B:** Spektroskopischer Photozyklus von BR. Der gezeigte Zyklus stellt eine Zusammenfassung bzw. einen Kompromiss aus verschiedenen Übersichtsartikeln dar [1, 10-12].

Vor der Belichtung nach langer Dunkelphase liegt Bakteriorhodopsin im dunkeladaptierten Grundzustand vor, welcher durch ein thermisches Gleichgewicht von Retinal-Konfigurationen charakterisiert ist [14, 15]. Nur die Licht-Anregung des all-*trans*,15-*anti*-Retinal führt zu dem hier beschriebenen Photozyklus mit Pumpaktivität:

Der Photozyklus beginnt mit der Absorption von Licht, wodurch das all-*trans*,15-*anti*-Retinal in einen angeregten Zustand überführt wird und zu 13-*cis*, 15-*anti* isomerisiert. In diesem ersten Teil des Photozyklus sind mehrere kurzlebige Photointermediate beschrieben (J, K und L). Im L-Intermediat ist das Retinal komplett isomerisiert, jedoch beschränken sich die strukturellen Bewegungen bisher größtenteils auf das Retinal selbst. Erst in den nachfolgenden Schritten wird die im angespannten Retinal gespeicherte Energie in Proteinstrukturänderungen umgewandelt. Durch die Isomerisierung des Retinals ändert sich die Orientierung des N⁺-H-Dipols der protonierten Schiff-Base [16]. Dadurch befindet sich das Proton in einem energetisch ungünstigeren Zustand, wodurch sich der pK_s-Wert der protonierten Schiff-Base reduziert. Bisher erfolgte jedoch keine einzige Protonenübertragung.

Die erste Protonenübertragung ist die Abgabe des Protons der Schiff-Base an den nächstbesten Protonenakzeptor (1. Schritt in Abbildung 3A). Dieser Akzeptor wird daher als der primäre Protonenakzeptor bezeichnet. In Bakteriorhodopsin übernimmt das Aspartat an Position 85 (BR-D85) diese Aufgabe. Dieses Aspartat ist im Dunkelnzustand deprotoniert und stabilisiert als Gegenion die positiv geladene Schiff-Base. Unter physiologischen Bedingungen wird unmittelbar darauf ein weiteres Proton aus dem extrazellulären „*proton-release-Komplex*“ an die Membranoberfläche bzw. in den extrazellulären Raum abgegeben (2. Schritt in Abbildung 3A). Der „*proton-release-Komplex*“ auf der extrazellulären Seite vom Retinal besteht aus Aminosäuren und Wassermolekülen, welche ein Proton enthalten [17]. Diese beiden Protonentransfer-Schritte finden im Übergang vom L-Intermediat zum M-Intermediat statt. In einigen Arbeiten wird der 2. Schritt in Abbildung 3A auch dem $M_1 \rightarrow M_2$ -Übergang zugeordnet [18].

Für das M-Photointermediat ist besonders charakteristisch, dass es durch die deprotonierte (=ungeladene) Schiff-Base gegenüber dem Grundzustand stark blauverschoben ist und dass es im Vergleich zu den vorherigen Photointermediaten eine lange Lebensdauer von circa 3-5 ms aufweist. Zusätzlich verändert sich auch die Proteinstruktur mit der Bildung des M-Zustandes. Besonders die Seitenkette des positiv geladenen Arginins an Position 82 klappt vom Gegenion-Komplex zum „*proton-release-Komplex*“. Darüber hinaus ändert sich während der Lebensdauer des M-Photointermediates der räumliche Zugang zur deprotonierten Schiff-Base. Daher wird das M-Intermediat in mindestens zwei weitere Intermediate aufgeteilt. Zuerst ist die deprotonierte Schiff-Base von der extrazellulären Seite für eine potentielle Reprotonierung zugänglich (M_1) und wechselt danach zur intrazellulären Seite (M_2). Dieser „*structural switch*“ ist entscheidend, um die Vektorialität des aktiven Protonentransportes zu erklären [19, 20]. Die Unterteilungen des M-Intermediates in einzelne M_x -Intermediate wurden verschieden diskutiert, vor allem in Hinblick auf deren Relevanz und Reversibilität.

In der zweiten Hälfte des Photozyklus erfolgen die Reprotonierung der Schiff-Base über den intrazellulären Halbkanal und die Rückkehr in den Grundzustand. Im Übergang vom M-Intermediat zum N-Intermediat bildet sich eine transiente Wasserkette zwischen der deprotonierten Schiff-Base und dem protonierten Aspartat an Position 96 [21, 22]. Über diese Wasserkette wird die Schiff-Base vom BR-D96 reprotoniert (3. Schritt in Abbildung 3A). Das BR-D96 wird daher als der primäre Protonendonator bezeichnet. Im Übergang vom N zum O-Intermediat wird BR-D96 über die zytoplasmatische Membranoberfläche reprotoniert (4. Schritt in Abbildung 3A). Im O-Intermediat liegt das Retinal wieder in der *all-trans* Konfiguration vor. Beim Übergang vom O-Intermediat in den Grundzustand wird ein Proton vom D85 zum „*proton-release-Komplex*“ übertragen und das gesamte Protein relaxiert (5. Schritt in Abbildung 3A).

Der hier vorgestellte Photozyklus ist nur ein vereinfachtes Modell und trifft auch nur für physiologische Bedingungen bei neutralem pH-Wert zu. Es sind weitere Photointermediate und Seitenwege in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel wird der „PQ-Zyklus“ durch die Absorption eines weiteren Photons durch das rote O-Intermediat gestartet, wobei sich freies 9-*cis*-Retinal bildet [23, 24]. Außerdem ist auch das Zurückschießen des M-Intermediates mit blauem Licht zurück in den Grundzustand möglich [25]. Bei diesem verkürzten Photozyklus liegt keine Netto-Pumpaktivität vor (siehe gestrichelter Pfeil in Abbildung 3B). Dies verdeutlicht die Komplexität der Photophysik und Photochemie von Bakteriorhodopsin.

1.2.2 Die Elektrophysiologie von Bakteriorhodopsin

Der entscheidende Nachteil der spektroskopischen Untersuchungen ist, dass der tatsächliche Ionentransport über die gesamte Membran überhaupt nicht gemessen wird. Für die direkte Untersuchung des Ionentransportes über die Membran sind elektrophysiologische Methoden geeignet. Hierfür wird das Rhodopsin in eine Membran eingebaut und der elektrische Strom mit Elektroden gemessen, welcher bei Belichtung über die Membran fließt. Dieser Abschnitt fasst den bisherigen Forschungsstand zu Bakteriorhodopsin aus elektrophysiologischer Sicht zusammenfassen. Die Kraft einer Protonenpumpe wird als protonenmotorische Kraft Δp („Proton Motive Force“, PMF) bezeichnet und ist in Abbildung 4 näher beschrieben. Details zur PMF sind von Krulwich *et al.* in einer Übersichtsarbeit über die bakterielle pH-Homöostase zusammengefasst [26].

für die "Proton Motive Force" gilt:	<u>Legende:</u>
$\Delta p = \Delta \psi - 59 \text{ mV} \times (\text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{out}})$	$\Delta \psi$ = elektrische Potentialdifferenz (in mV)
im elektrochemischen Gleichgewicht gilt:	R = Universelle Gaskonstante
$\Delta p = 0$ und $\Delta \psi = E_{\text{rev}}$	F = Faraday – Konstante
Daraus ergibt sich die Nernst Gleichung für H^+ :	Δp = Proton Motive Force ("PMF", in mV)
	E_{rev} = Umkehrpotential
$E_{\text{rev}} = 59 \text{ mV} \times (\text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{out}})$	<u>Hinweise:</u>
bzw.	$\ln \frac{c_{\text{H}^+_{\text{out}}}}{c_{\text{H}^+_{\text{in}}}} = 2.3 \log \frac{c_{\text{H}^+_{\text{out}}}}{c_{\text{H}^+_{\text{in}}}} = 2.3(\text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{out}})$
$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{zF} \times \ln \frac{c_{\text{H}^+_{\text{out}}}}{c_{\text{H}^+_{\text{in}}}}$	$2.3 \frac{RT}{F} = 59 \text{ mV}$ (bei 25 °C)

Abbildung 4: Die protonenmotorische Kraft von Protonenpumpen. Die „Proton Motive Force“ (Δp , PMF) ist das elektrochemische Potential (ausgedrückt als Spannung), welches eine Protonenpumpe an einer Zellmembran erzeugen kann. Daher besteht die PMF aus einer chemischen (ΔpH) und einer elektrischen ($\Delta \psi$) Komponente.

Die ersten grundlegenden Erkenntnisse zu den elektrochemischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin wurden mit Hilfe von Proteoliposomen von der Gruppe von V.P. Skulachev publiziert [27]. Es konnte gezeigt werden, dass Bakteriorhodopsin das Innere von Proteoliposomen unter Belichtung ansäuert und dass sich sowohl eine elektrische Potentialdifferenz ($\Delta \psi$) als auch ein pH-Gradient (ΔpH) bildet. In weiteren Publikationen wurde gezeigt, dass Bakteriorhodopsin bei physiologischen pH-Bedingungen eine PMF (Δp) von circa 300 mV aufbringen kann [28, 29]. Elektrophysiologisch ließen sich zwei Prozesse vom Photozyklus messen. Zum einen die schnelle Deprotonierung der Retinal-Schiff-Base (RSB) und dem damit verbundenen Protonentransfer zur extrazellulären Seite innerhalb von circa 50-100 μs , sowie die langsamere Reprotonierung innerhalb von 6-15 ms [30].

Vieler dieser Experimente wurden mit Proteoliposomen an „Black Lipid Membranes“ (BLM) durchgeführt. In den nachfolgenden Jahren wurden Messungen mit verbesserte Methoden publiziert, wie zum Beispiel die gerichtete Einbettung von Bakteriorhodopsin in Acrylamid-Gele [31]. Es ist jedoch bekannt, dass die bisherigen Untersuchungs-Systeme anfällig für Artefakte sein können [32-35]. Darüber hinaus führten hohe Konzentrationen an BR in Vesikeln bei Belichtung zu einer

Alkalisierung des äußeren Mediums. Es wurde jedoch eine besonders starke Ansäuerung des äußeren Mediums erwartet, siehe hierzu *figure 8-9* in Schobert *et al.* [36]. Diese Effekte in Vesikeln aus *Halobacterium salinarum* konnten bisher nur über die Existenz eines endogenen Na^+/H^+ -Antiporers erklärt werden [37].

Letztendlich entsprachen die Messungen an artifiziellen Membransystemen nicht den physiologischen Bedingungen in nativen Membranen. Zudem konnte in den artifiziellen Membransystemen die Spannungsabhängigkeit des Ionentransportes überhaupt nicht oder nur eingeschränkt untersucht werden. Eine Lösung war die heterologe Expression der Rhodopsine in nativen Zellen, an welchen nun electrophysiologische Untersuchung mit der „Patch-Clamp“-Technik und der „Two-Elektrode Voltage Clamp“-Methode (TEVC) durchgeführt werden konnten. Dies gelang mit Oozyten aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* und mit humanen embryonalen Nierenzellen, den sogenannten HEK293-Zellen [38-41].

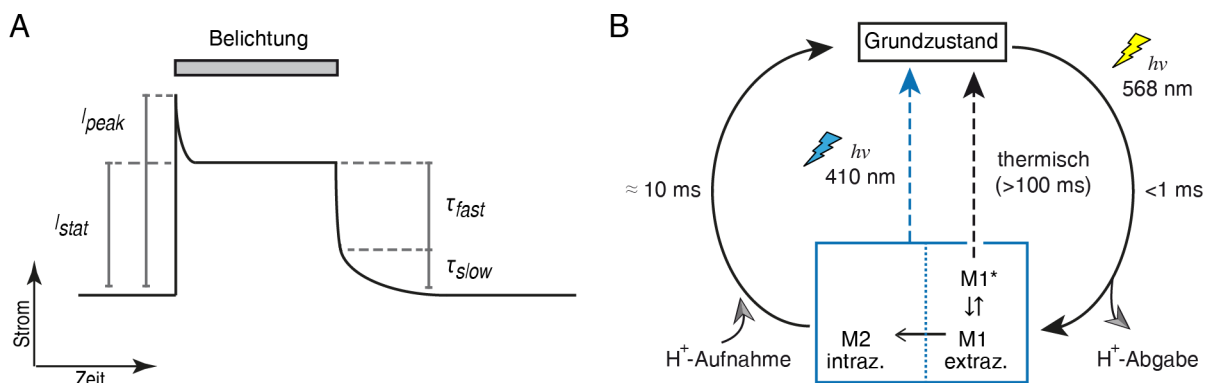


Abbildung 5: Elektrophysiologie von Bakteriorhodopsin. A: Schematische Stromspur einer Protonenpumpe mit verschiedenen charakteristischen Parametern. B: Elektrophysiologischer Photozyklus modifiziert nach Geibel *et al.* [40].

Zusammengefasst wurden folgende Erkenntnisse gewonnen (siehe ergänzend hierzu Abbildung 5), welche den aktuellen Stand der Forschung zu den elektrophysiologischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin darstellen:

1. Die Photoströme sind stets auswärts gerichtet und sind sowohl von der Spannung als auch vom pH-Wert abhängig [40].
2. Bei Belichtung ist initial ein transienter Strom zu beobachten, welcher als die Deprotonierung der Schiff-Base unter Bildung des M_1 -Photointermediates interpretiert wird [40]. Der transiente Strom geht unter Dauerlicht in einen stationären Strom über, welcher die Nettopumpaktivität unter den jeweiligen Messbedingungen repräsentiert.
3. Nach Ende der Belichtung geht der stationäre Photostrom auf die Basislinie zurück. Diese *off*-Kinetik kann bi-exponentiell mit einer schnellen Zeitkonstante ($\tau_{\text{fast}} \approx 1-3$ ms) und einer langsamen Zeitkonstante ($\tau_{\text{slow}} =$ circa 80 ms bei -160 mV und 20 ms bei +60 mV) gefittet werden. Hierbei ist nur die langsame Zeitkonstante sehr spannungsabhängig [40]. Die bi-exponentielle Kinetik beschreibt zugleich die Kinetik der Umwandlung vom M_2 -Photointermediat zurück zum BR-Grundzustand, weil der M-Zerfall den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Photozyklus darstellt.
4. Das Umkehrpotential (E_{rev}) von Bakteriorhodopsin liegt bei neutralem pH-Wert im Bereich von -250 bis -220 mV, wenn E_{rev} durch lineare Extrapolation bestimmt wird [40, 41]. Im Experiment verschiebt sich das Umkehrpotential um jeweils ≈ 34 mV, wenn der extrazelluläre

pH-Wert um eine pH-Einheit geändert wird [40]. Die pH-Abhängigkeit von E_{rev} würde nach der Nernst-Gleichung 59 mV pro pH-Einheit (bei 25 °C) betragen. Die genaue Ursache für diese Abweichung ist unklar.

5. Der mit Grünlicht erzeugte stationäre Photostrom kann durch zusätzliche Belichtung mit Blaulicht wieder reduziert werden [40]. Hierbei wird der M-Zustand über einen Blaulicht-induzierten Seitenweg direkt in den Grundzustand zurückgeführt [25]. Über diesen Seitenweg fließt kein Nettostrom, weil die Schiff-Base über den extrazellulären Bereich reprotoniert wird.
6. Es wurde ein zusätzlicher Photozyklus-Weg postuliert, welcher ohne Netto-Pumpstrom vom M_1 -Intermediat über das weitere M_1^* -Intermediat zurück zum Grundzustand führt [40]. Dieser Photozyklus-Weg kann ebenfalls mit Blaulicht induziert werden, aber erfolgt auch thermisch in >100 ms ($t_{thermisch} = 150-380$ ms je nach Spannung). Die Existenz eines M_1^* -Intermediat bietet auch eine Erklärung für die bi-exponentielle *off*-Kinetik (siehe Punkt 3).
7. Das Verhältnis der Photointermediate M_1 , M_1^* und M_2 ist spannungsabhängig [40]. Je positiver die Spannung ist, desto mehr wird die Bildung von M_2 und damit die Vollendung des Photozyklus mit Netto-Pumpstrom begünstigt. Daher ist der Blaulicht-Effekt und der Photozyklus-Seitenweg über M_1^* bei negativen Spannungen zu beobachten.

Es ist anzumerken, dass die Existenz eines M_1^* -Intermediates nicht allgemein akzeptiert ist und auch andere Erklärungen für die beobachteten Phänomene in den elektrophysiologischen Experimenten existieren. Zum Beispiel wurde ein größerer Einfluss vom O-Intermediat zum elektrophysiologischen Profil der Protonenpumpen diskutiert [42].

1.2.3 Unterscheidung und Definition von aktiven und passiven Transport

Allgemein wird unter einem aktiven Transport ein Transportvorgang verstanden, welcher unter Energieverbrauch Stoffe bzw. Ionen gegen einen Gradienten transportiert oder einen Gradienten aufbaut. Passiver Transport erfolgt stattdessen ohne Energieverbrauch und entlang eines Gradienten. Aufgrund der Bedeutung von aktiven und passiven Transportvorgängen in dieser Arbeit wird diesem Themenfeld hier ein eigener Abschnitt gewidmet, denn diese Unterscheidung ist nicht immer trivial: Ist ein aktiver Ionen-Transporter überhaupt noch eine „Pumpe“, wenn der Transport entlang und nicht gegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgt? Der elektrochemische Gradient würde dann die Pumpe „bei ihrer Arbeit“ unterstützen.

Daher müssen Kriterien herangezogen werden, um aktiven und passiven Transport voneinander unterscheiden zu können. In der Elektrophysiologie kann als Kriterium das Umkehrpotential verwendet werden, wobei das theoretische Umkehrpotential für passiven Transport (siehe Abbildung 4 im vorherigen Abschnitt) mit den gemessenen Umkehrpotentialen verglichen wird. Beispielsweise zeigen viele spannungsaktivierte Protonenkanäle (H_v -Kanäle) immer nur auswärts gerichtete positive Ströme [43], jedoch entsprechen ihre Umkehrpotentiale den theoretischen Umkehrpotentialen für passiven Protonentransport. Daher sind H_v -Kanäle keine Protonenpumpen, sondern passive Protonenkanäle.

Die Begriffe sind in dieser Arbeit wie folgt definiert:

- Passiver lichtaktivierter Transport: Darunter werden alle stationären Photoströme verstanden, deren Umkehrpotentiale den theoretischen Umkehrpotentialen von passiven Protonentransport entsprechen. Hierbei ist nicht zwingend notwendig, dass auch tatsächlich in beide Transportrichtungen passive Photoströme zu beobachten sind.
- Aktiver lichtgetriebener Transport („Pumpaktivität“): Darunter werden alle unidirektionalen stationären Photoströme verstanden, deren extrapolierten Umkehrpotentiale sich von den theoretischen Umkehrpotentialen von passiven Protonentransport unterscheiden.
- Pump-Kanal-Dualismus: Darunter wird das Phänomen verstanden, wenn bei einem Konstrukt auswärts und einwärts gerichtete stationäre Photoströme zu beobachten sind. Die Umkehrpotentiale unterscheiden sich jedoch von den theoretischen Umkehrpotentialen für passiven Protonentransport.
- Transiente Peak-Ströme: Als transiente Peak-Ströme werden grundsätzlich alle Photoströme bezeichnet, welche beim gegenseitigen Wechsel zwischen Dauerbelichtung und Nicht-Belichtung zeitlich befristet auftreten und daher die Form eines „Peaks“ aufweisen (vgl. Abbildung 5A).

Am Ende dieser Arbeit wird sich zeigen, dass einige „Peak-Ströme“ wahrscheinlich das Ergebnis aus der Überlagerung von zwei stationären Strömen mit verschiedenen Kinetiken darstellen (siehe Diskussion ab Abschnitt 3.1).

- Inaktivierung: Unter Inaktivierung eines Ionentransporters wird der Übergang von einem leitenden in einen inaktiven Zustand verstanden. Inaktivierung kann sowohl bei aktiver als auch passiver Transportaktivität auftreten.
Insbesondere im Rahmen dieser Arbeit wird unter Inaktivierung die unerwartet starke Reduktion von stationären Photoströmen bei sich ändernden elektrochemischen Bedingungen verstanden. Ein solcher Fall kann zum Beispiel eintreten, wenn ein Transportprotein unter bestimmten pH-Bedingungen durch Protonierung/Deprotonierung essenzieller Aminosäuren zunehmend unfunktional wird, obwohl bei alleiniger Betrachtung des elektrochemischen Gradienten weiterhin eine Transportfunktion zu erwarten wäre.
Die Definierung der Inaktivierung ist für diese Arbeit besonders wichtig, weil bei Kanalrhodopsinen (siehe Abschnitt 1.3.3) unter Inaktivierung hauptsächlich das Verhältnis aus dem transienten zum stationären Strom verstanden wird [44].

1.3 Weitere Ionen-transportierende Rhodopsine

1.3.1 Lichtgetriebene Ionen-Pumpen

Neben Bakteriorhodopsin sind mittlerweile tausende weitere lichtgetriebene Protonenpumpen bekannt [45], wobei keine von diesen so intensiv wie Bakteriorhodopsin untersucht wurde. Die meisten dieser Protonenpumpen sind nur aufgrund der Sequenz als Protonenpumpe postuliert. Zumindest für einige Protonenpumpen wurde elektrophysiologisch gezeigt, dass diese lichtgetriebene Auswärtsströme zeigen. Hierzu zählen zum Beispiel das Archaerhodopsin-3 aus dem Archaeon *Halorubrum sodomense* (Arch-3) und das *Leptosphaeria*-Rhodopsin aus dem Pilz *Leptosphaeria maculans*, welches als Mac oder LR abgekürzt wird [46-48]. Sowohl Arch-3 als auch Mac spielen eine wichtige Rolle in der Optogenetik, weil diese sehr gut in Neuronen exprimieren (siehe Abschnitt 1.4). Tatsächlich wurden bisher nur wenige Protonenpumpen intensiver elektrophysiologisch untersucht. Hierzu zählen neben dem Bakteriorhodopsin selber bisher nur das *Acetabularia*-Rhodopsin-1 aus der marinen Alge *Acetabularia acetabulum* und das CarO-Rhodopsin aus dem Pilz *Fusarium fujikuroi* [42, 49]. Eine Sonderrolle nehmen die Protonenpumpen ein, welche zu den Proteorhodopsin-artigen gezählt werden. Diese haben vergleichsweise große Unterschiede zu Bakteriorhodopsin und werden daher im folgenden Abschnitt 1.3.2 näher erläutert.

Außer den Protonenpumpen sind auch Chlorid- und Natriumpumpen bekannt (Abbildung 1), welche jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit stehen. Historisch betrachtet wurden nach Bakteriorhodopsin zuerst die Halorhodopsine entdeckt, welche aktiv Chlorid-Ionen in die Zellen hinein pumpen [36]. Elektrophysiologische Untersuchungen des Halorhodopsins aus dem Archaeon *Natronomonas pharaonis* (NpHR) in Oozyten bestätigten unter kontrollierten Spannungen, dass die Halorhodopsine einwärts gerichtete Chloridpumpen sind [50]. Vergleichsweise neu und entsprechend wenig charakterisiert sind die lichtgetriebenen Natriumpumpen [51]. Sie sollen aktiv Natrium aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum pumpen. Eine elektrophysiologische Charakterisierung der lichtgetriebenen Natriumpumpen steht noch aus.

1.3.2 Protonenpumpen vom Proteorhodopsin-Typ

Proteorhodopsine umfassen eine große Gruppe von Protonenpumpen. Das erste Proteorhodopsin („Green-Proteorhodopsin“, GPR) wurde in dem marinen γ -Proteobakterium EBAC31A08 gefunden und ist daher namensgebend [52]. Mittlerweile sind auch viele Proteorhodopsin-artige Protonenpumpen (PR-Typ) in Bakterienstämmen gefunden wurden, welche nicht zu den Proteobakterien zählen.

Das dominierende Erkennungsmerkmal der Proteorhodopsine ist, dass der primäre Protonendonator ein Glutamat ist. In den Bakteriorhodopsin-artigen Protonenpumpen (BR-Typ) ist stattdessen ein Aspartat hoch konserviert (D96 in BR). Darüber hinaus besitzen Proteorhodopsine auch weitere charakteristische konservierte Bereiche in der Aminosäure-Sequenz welche in den Protonenpumpen vom BR-Typ nicht vorkommen und in einem Übersichtsartikel von Bamann *et al.* zusammengefasst sind [53]. Daraus resultieren Unterschiede zwischen Pumpen vom PR-Typ und BR-Typ. Hierzu zählt zum Beispiel der ungewöhnlich hohe pK_s -Wert vom primären Protonendonator mit circa 7,5 im Vergleich zu $\approx 2,5$ in BR.

Aus elektrophysiologischer Sicht besonders interessant sind die Publikationen zu einwärts gerichteten Photoströmen beim GPR, welche bei negativen Haltespannungen und niedrigen extrazellulären pH-Werten beobachtet werden konnten [54-56]. Dagegen konnte in Experimenten mit GPR exprimierenden *E.coli*-Zellen und in Proteoliposomen keine einwärts gerichteten Ströme beobachtet werden [57, 58]. Auch weitere Publikationen von GPR in orientierten Acrylamid-Gelen sprechen gegen einwärts gerichtete Ströme [59]. Es ist unklar, worauf die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Systemen genau zurückzuführen sind.

Neben dem „Green-Proteorhodopsin“ zählen, basierend auf der Protein-Sequenz, weitere Protonenpumpen zu den Proteorhodopsinen. Hierzu gehört zum Beispiel das Xanthorhodopsin (XR) aus dem Bakterium *Salinibacter ruber*, welches neben Retinal ein zusätzliches Chromophor bindet, um die Lichtausbeute zu erhöhen [60, 61]. Elektrophysiologische Messungen von XR sind bisher noch nicht in heterologen Expressionssystemen gelungen. Weitere vor allem spektroskopisch untersuchte Rhodopsine vom PR-Typ sind das *Gloeobacter*-Rhodopsin (GR) aus dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 sowie das *Exiguobacter*-Rhodopsin (ESR) aus dem Bakterium *Exiguobacterium sibiricum* [62-64]. ESR nimmt unter allen Protonenpumpen eine Sonderrolle ein, weil sich an der Position des primären Protonendonors ein Lysin befindet. Hierdurch muss sich zwangsweise ein anderer Photozyklus im Vergleich zu BR ergeben [65]. Neben ESR ist bisher nur die Protonenpumpe „E17R“ bekannt, welche ebenfalls ein Lys an der Position des primären Protonendonors trägt, jedoch stammt das Rhodopsin ebenfalls aus der Gattung *Exiguobacterium* [66]. Zum Ende dieser Arbeit ist auch eine weitere Klasse von Protonenpumpen bekannt geworden, welche aktiv Protonen pumpen soll. Bei dieser Klasse sind der Protonendonor und sein Interaktionspartner durch ein Glycin (\triangle BR-D96) und ein Histidin (\triangle BR-T46) ersetzt [67].

Im folgenden Abschnitt in Abbildung 6 ist ein Sequenz-Alignment von den drei wichtigsten Protonenpumpen für diese Arbeit und dem Kanalrhodopsin ChR2 gezeigt. Die verwendeten Protonenpumpen sind das Bakteriorhodopsin, das *Coccomyxa*-Rhodopsin (CsR, BR-Typ) aus der Alge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 [68] und das *Gloeobacter*-Rhodopsin (PR-Typ). Ein weiteres Alignment weiterer Pumpen vom BR-Typ und dem PR-Typ ist im Ergebnisteil in Abbildung 24 gezeigt.

1.3.3 Lichtaktivierte Kanalrhodopsine

Lange Zeit waren nur die lichtgetriebenen Ionenpumpen bekannt. Mit der Entdeckung der lichtgesteuerten Kanalrhodopsine erfuhr die Erforschung der mikrobiellen Rhodopsine neue Impulse. Die zuerst entdeckten Kanalrhodopsine waren die Kationenkanäle ChR1 und ChR2 aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [69-71], welche die Alge zur Phototaxis befähigen [72, 73]. In elektrophysiologischen Messungen zeigen die Kanalrhodopsine je nach elektrochemischem Gradienten entweder einwärts oder auswärts gerichtete Photoströme. Generell transportieren die Kanalrhodopsine vor allem Protonen, wobei auch weitere Kationen mit geringer Ionenselektivität geleitet werden. Kanalrhodopsine haben wie alle mikrobielle Rhodopsine eine 7-Transmembran-Struktur und binden kovalent Retinal über einen Lysin-Rest. Insbesondere ChR2 entwickelte sich zum Modell-Kanalrhodopsin und wurde bisher am besten untersucht [44, 74]. Im Jahr 2015 wurde auch die Existenz von natürlich vorkommenden Anion-Kanalrhodopsinen beschrieben, wodurch sich die Familie der Ionen-transportierenden Rhodopsine noch einmal vergrößerte [75]. Durch die erste Röntgenkristallstruktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2 aus ChR1 und ChR2 wurde das Verständnis

über Kanalrhodopsine auf molekularer Ebene entscheidend erweitert [76]. Die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Kanalrhodopsinen und Pumpen werden ausführlich zusammen mit den eigenen Ergebnissen in Abschnitt 3.2 diskutiert.

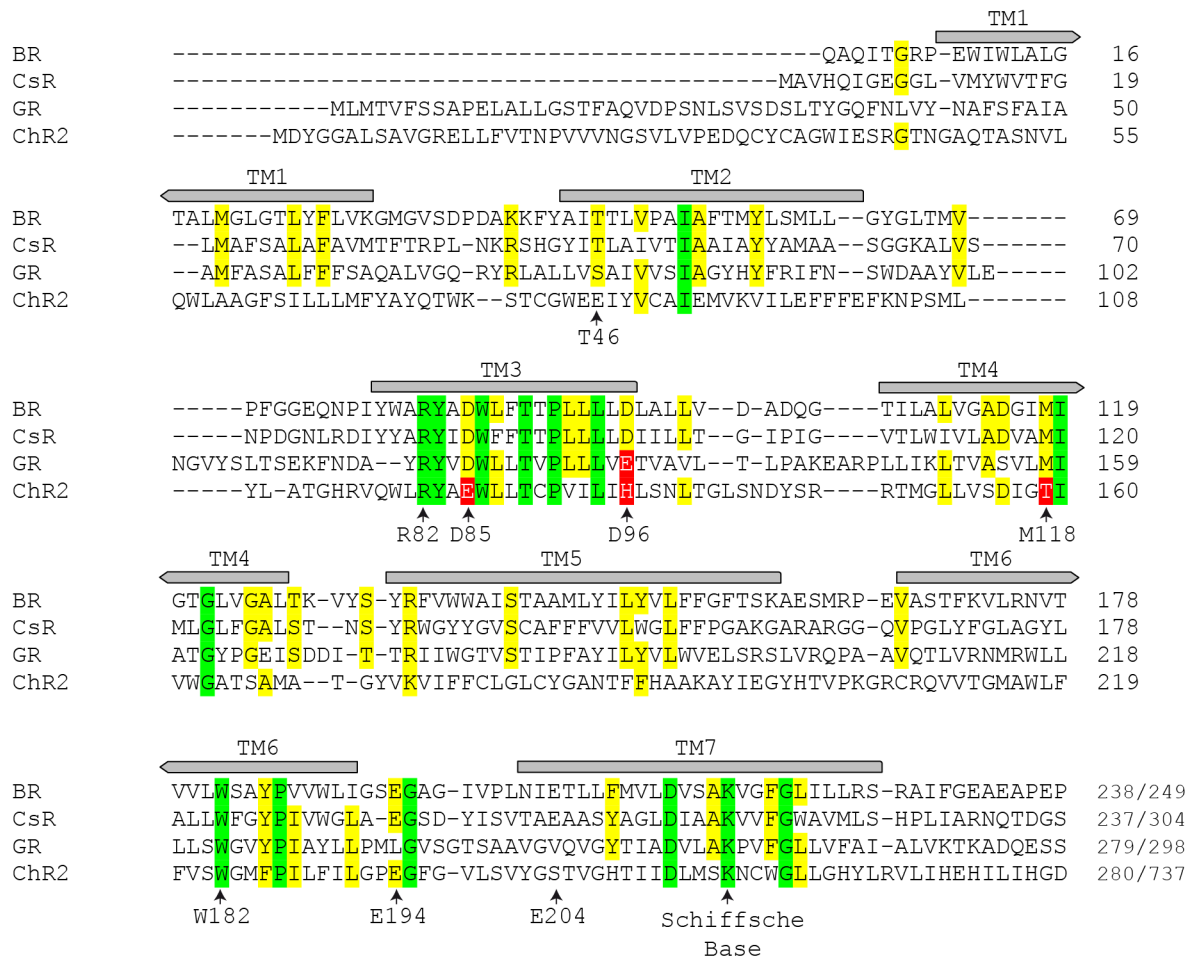


Abbildung 6: Sequenz-Alignment des Kanalrhodopsins ChR2 mit ausgewählten Protonenpumpen. Das Alignment der Protonenpumpen BR, CsR und GR untereinander wurde mit dem web-basierten Tool Clustal Omega (www.ebi.ac.uk) durchgeführt. Der Vergleich der Protonenpumpen mit ChR2 und die Transmembranbereiche beruhen auf dem strukturbasierten Alignment von Kato *et al.* [76]. Hoch konservierte Positionen sind grün markiert. Gelb markierte Bereiche kennzeichnen weitestgehend konservierte Bereiche. Die mit Pfeilen markierten Positionen kennzeichnen einige relevante Positionen für diese Arbeit in BR. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Die Strukturaufklärung der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2 ermöglichte bessere Sequenz-Alignments mit anderen mikrobiellen Rhodopsinen. Abbildung 6 zeigt das Sequenz-Alignment von ChR2 mit den Protonenpumpen BR, CsR und GR. In grün sind alle hoch konservierten Positionen gekennzeichnet. Gelb markierte Positionen kennzeichnen weitestgehend konservierte Bereiche. Mit Rot sind der Protonenakzeptor (BR-D85) und der Protonendonor (BR-D96) gekennzeichnet. Zusätzlich ist die Position BR-M118 gekennzeichnet, weil diese in den Abschnitten 2.3.8 und 2.5.1 von besonderer Relevanz ist.

In der bisherigen Literatur wurde noch nicht festgestellt, dass GR in einigen Bereichen mehr mit ChR2 als mit den Protonenpumpen vom BR-Typ verwandt ist (vor allem in den Transmembranbereichen 6 und 7). In der Diskussion im Abschnitt 3.2 werden die Strukturen von Protonenpumpen und Kanalrhodopsinen zusammen mit den Ergebnissen detaillierter besprochen.

1.4 Anwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik

In den letzten zehn Jahren gewannen die Grundlagenforschung und die angewandte Forschung zu mikrobiellen Rhodopsinen deutlich an Bedeutung. Der Grund dafür ist, dass mikrobielle Rhodopsine als „optogenetische Tools“ verwendet werden können. Optogenetik ist allgemein die Verwendung von lichtsensitiven genetisch kodierbaren Biomolekülen, um gezielt Prozesse in einzelnen Zellen oder ganzen Organismen mit Hilfe von Licht zu steuern. Bis zum Jahr 2010 wurden circa 100 Publikationen unter dem Begriff „*optogenetic*“ veröffentlicht. Im Zeitraum von 2010 bis 2015 sind zusätzlich 2000 neue Publikationen hinzugekommen, was die Bedeutung und die rasante Entwicklung der Optogenetik demonstriert. In Abbildung 7 ist die Verwendung der Ionen-transportierenden Rhodopsine zur Kontrolle neuronaler Aktivität gezeigt.

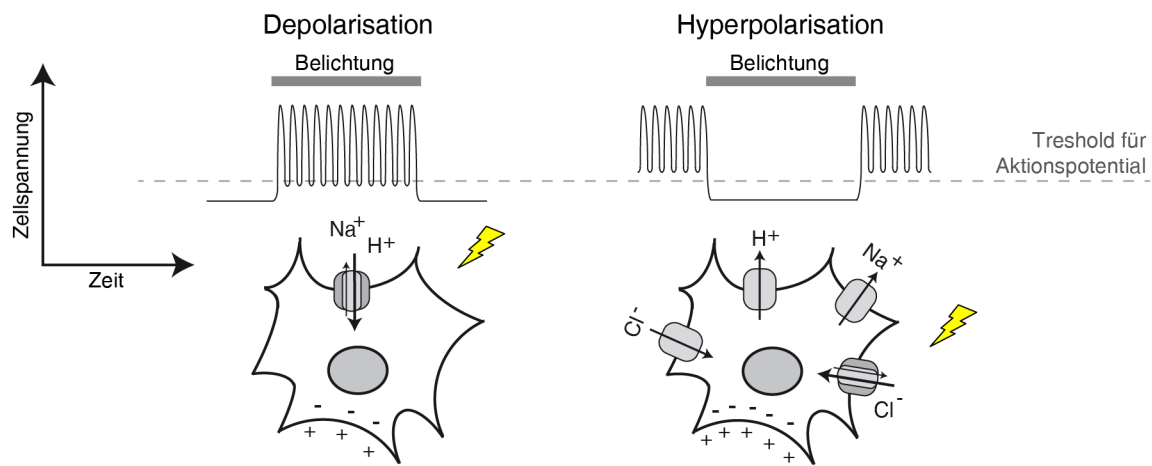


Abbildung 7: Verwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik. Gezeigt ist das Beispiel der Kontrolle von Aktionspotentialen in Neuronen mit Licht. Aktionspotentiale lassen sich mit unselektiven Kation-leitenden Kanalrhodopsinen auslösen. Dagegen können einwärts gerichtete Chloridpumpen, Anionen-Kanäle oder auswärts gerichtete Protonen- und Natriumpumpen zur Inhibition von Aktionspotentialen verwendet werden. Darüber hinaus existieren weitere Anwendungen mikrobieller Rhodopsine.

Im engeren Sinne wird unter Optogenetik die Untersuchung und Manipulation neuronaler Aktivität mit Licht verstanden. Zwar existierten bereits früher Strategien, um Neuronen mit Licht zu steuern [77, 78], jedoch brachte erst die Verwendung von ChR2 den Durchbruch im Jahr 2005 [79-81]. Die Belichtung von Neuronen, welche ChR2 in ihrer Membran exprimieren, führt zur Depolarisation der neuronalen Zellmembran, wodurch die Reizschwelle zum Auslösen von Aktionspotentialen erreicht wird. Im Gegensatz dazu können Ionenpumpen verwendet werden, um Aktionspotentiale durch Hyperpolarisation zu inhibieren [48, 82]. Unter den Pumpen haben sich bisher vor allem die Chloridpumpe NpHR und die beiden Protonenpumpen Arch-3 und Mac in der Optogenetik etabliert [48, 83]. Die natürlichen lichtaktivierbaren Anion-Kanalrhodopsine können ebenfalls als „inhibitorische Tools“ verwendet werden [75]. Darüber hinaus können Protonenpumpen durch lokale pH-Änderung, unabhängig von ihrer hyperpolarisierenden Wirkung, die Reizweiterleitung an Synapsen beeinflussen [84, 85].

Protonenpumpen spielen zunehmend auch als Spannungs-Sensoren eine Rolle. Diese Spannungs-Sensoren dienen zur nicht-invasiven Messung der Zellspannung und zur Detektion von Aktionspotentialen in Neuronen. Dies gelang zuerst in *E.coli* mit Proteorhodopsin und später mit Arch-3 in Neuronen [86, 87].

Hierbei wird die spannungsabhängige Fluoreszenz von Photointermediaten der Protonenpumpen ausgenutzt, wobei die Fluoreszenz über einen 3-Photonenprozess erfolgt [88]. Durch Mutation des primären Protonendonors konnte die Lebenszeit der gewünschten Photointermediate erhöht werden, während der in diesem Falle ungewünschte Pumpstrom gleichzeitig fast komplett reduziert werden konnte. Weitere Optimierungen durch Einführung von Mutationen in Arch-3 führten letztendlich zu Varianten, welche bereits durch einen 1-Photonenprozess als Spannungs-Sensoren fungieren [89].

1.5 Modifizierung der Eigenschaften von mikrobiellen Rhodopsinen

Grundsätzlich verfolgt die Modifikation der Rhodopsine zwei Ziele: Zum einen dient es dazu, mehr über die grundlegenden Eigenschaften der Rhodopsine zu erfahren. Zu den Eigenschaften aus elektrophysiologischer Sicht gehören: die kinetischen Parameter, die Ionenselektivitäten, die Strom-Spannungsabhängigkeiten und die Aktionsspektren. Zum anderen können dadurch die Rhodopsine für optogenetische Anwendungen optimiert werden. Insbesondere mit Rotlicht anregbare Rhodopsine sind in der Optogenetik gefragt. Der Hauptgrund hierfür ist, dass rotes Licht am tiefsten in Gehirngewebe eindringen kann [90]. Alternativ könnten bei gleicher Gewebetiefe geringere Lichtintensitäten eingesetzt werden. Außerdem können rotverschobene Varianten mit Blaulicht-aktivierbaren Proteinen und Sensoren kombiniert werden.

Bisher lag der Schwerpunkt für die Optimierung elektrophysiologischer Eigenschaften von mikrobiellen Rhodopsinen bei Kanalrhodopsinen. Zum Beispiel konnte mit Hilfe von Chimären erfolgreich das Aktionsspektrum der Kanalrhodopsine verschoben werden [91]. Die Mutante ChR2-L132C („CatCh“) zeigt eine erhöhte Ca^{2+} -Leitfähigkeit [92]. Mutationen an der Position ChR2-E123 („ChETA-Mutanten“) zeigen eine schnellere Kinetik sowie eine verringerte Spannungsabhängigkeit der Kinetik [93]. Dagegen verbesserten Punktmutationen an den Positionen T159 und D156 in ChR2 hauptsächlich die Stromamplituden, unter anderem durch verbesserte Retinal-Bindung und erhöhte Proteinstabilität [94-96]. Mechanistisch sind besonders die Kanalrhodopsine mit Mutationen an der Position ChR2-C128 interessant. Diese zeigen sehr langsame *off*-Kinetiken, wobei die Kanäle bereits vorzeitig mit Blaulicht geschlossen werden können [97]. Letztendlich zeigte jedoch die Entdeckung neuer natürlich vorkommender Kanalrhodopsine, dass bereits in der Natur ein breites Spektrum an Kanalrhodopsinen mit diversen Eigenschaften existiert. Hierzu zählen beispielsweise die Kanalrhodopsine „Chrimson“ oder „Chronos“, welche mit Rotlicht aktivierbar sind bzw. eine sehr schnelle Kinetik aufweisen [98].

Im Vergleich zu den Kanalrhodopsinen sind nur wenige modifizierte Pumpen mit optogenetischer Relevanz bekannt. Hier wäre zum einen die mit Rotlicht getriebene Chloridpumpe „Jaws“ zu erwähnen, welche durch einzelne Mutationen bezüglich der Stromamplitude verbessert wurde [99]. Im Gegensatz zu den Kanalrhodopsinen gestaltet sich das „*color-tuning*“ offenbar komplizierter. Zwar wurde prinzipiell gezeigt, dass „*color-tuning*“ von Protonenpumpen wie GPR, GR und Arch-3 durchaus über ein weites Spektrum möglich ist, jedoch führte dies meist auch zur Reduzierung oder zum Verlust der Pumpaktivität [100-102]. Prinzipiell lässt sich auch die Kinetik der Pumpen modifizieren, jedoch ist eine Verlangsamung der Kinetik immer mit der Reduzierung der Stromamplituden verbunden [41, 55]. Eine Veränderung der Ionenselektivität der Protonenpumpe BR durch die Mutationen D85T/S von einer Protonenpumpe zu einem Chloridtransporter wurde zwar

publiziert, jedoch wurden diese Beobachtungen kritisch diskutiert und bisher nicht elektrophysiologisch in nativen Membranen mit gesicherter Orientierung bestätigt [103, 104]. Zudem ist die Veränderung der Ionenselektivität von BR mit einer drastischen Reduzierung der Stromamplituden verbunden. Von allen Versuchen die Pumpen für die Optogenetik zu optimieren war bisher die Optimierung von Arch-3 für das „*voltage-sensing*“ am erfolgreichsten [89].

Eine weitere Strategie zur Untersuchung und Modifizierung mikrobieller Rhodopsine, neben Mutationen und Chimären, ist der Einbau synthetischer oder natürlicher Retinal-Analoga. Aus Sicht der Grundlagenforschung können hierüber viele Fragen über die Retinal-Bindung und deren Effekte untersucht werden. Speziell für die Anwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik spielt der Einbau von Retinal-Analoga mit unterschiedlichen Absorptionseigenschaften eine Rolle, weil hierdurch die spektralen Eigenschaften der Rhodopsine verändert werden könnten. Aufgrund der Bedeutung von Retinal-Analoga für diese Arbeit wird im folgenden Abschnitt gezielt auf diese Thematik eingegangen.

1.6 Retinal und dessen Derivate als Cofaktor in Rhodopsinen

1.6.1 Grundlagen zu den Absorptionseigenschaften von Rhodopsinen

In allen mikrobiellen Rhodopsinen ist das Retinal kovalent an einen Lysin-Rest innerhalb des Membranproteins gebunden. Das Protein ohne Retinal wird als Opsin bezeichnet. Als Lichtsensor bestimmt das Retinal das Aktions- und Absorptionsspektrum des Rhodopsins. Dabei spielt nicht nur das Retinal selbst eine Rolle, sondern auch die chemische Bindung und die Wechselwirkungen mit dem Opsin.

Dass Retinal im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbiert, liegt am ausgedehnten delokalisierten π -Elektronensystem. Daher spielt die Planarität und die Verteilung von Ladungen eine Rolle für die Absorptionseigenschaften. Eine spektrale Verschiebung erfolgt dann, wenn sich die Energiedifferenz zwischen dem „*ground-state*“ und dem „*excited-state*“ vom Retinal ändert [1]. Eine Verringerung der Energiedifferenz führt zu einer Rotverschiebung (bathochrom), während eine Erhöhung zu einer Blauverschiebung (hypsochrom) führt. Das genauere Spektrum des Retinals innerhalb des Proteins wird hauptsächlich dadurch bestimmt, ob es als protonierte oder deprotonierte Schiff-Base vorliegt und ob und in wie weit das Gegenion die protonierte Schiff-Base stabilisieren kann. Details zu den wichtigsten Faktoren für die Absorptionseigenschaften sind in Übersichtsarbeiten von Mogens B. Nielsen und Wang *et al.* zusammengefasst [105, 106]. Im Folgenden ist eine kurze Zusammenfassung mit den bekannten Absorptionswerten von freiem und gebundenem Retinal aufgeführt:

1. Freies ungebundenes Retinal absorbiert je nach Lösungsmittel im Bereich von 370-380 nm. Durch die Bindung des Retinals an das Opsin, unter Ausbildung einer protonierten Schiff-Base, verschiebt sich das Absorptionsspektrum zu höheren Wellenlängen. Im Falle von Bakteriorhodopsin verschiebt sich das Absorptionsmaximum bis zu 568 nm.
2. Das Retinal, gebunden an ein *n*-Butylamin über eine protonierte Schiff-Base, absorbiert bei 610 nm im Vakuum [107]. Das Maximum der deprotonierten Form der Retinal-Schiff-Base liegt im Vakuum bei 478 nm.

3. Die Absorption-Differenz zwischen dem Rhodopsin und einer ungebundenen protonierten Schiff-Base (an ein *n*-Butylamin gekoppelt) wird als „opsin-shift“ bezeichnet [108]. Dieser „opsin-shift“ ist daher als Blauverschiebung (610 nm → 568 nm) zu betrachten [109].
4. Früher wurde der „opsin-shift“ als Rotverschiebung betrachtet (440 nm → 568 nm). Der Grund hierfür war, dass früher nur 440 nm als Absorptions-Maximum für die protonierte Schiff-Base (an ein *n*-Butylamin gebunden) bestimmt wurde. Durch die Messung im Vakuum konnte nun der Einfluss der Lösungsmittel ausgeschlossen werden.
5. Die Proteinumgebung mit Gegenion verursacht eine Blauverschiebung, weswegen die Rhodopsine nicht bei 610 nm wie im Vakuum absorbieren, sondern im kurzwelligeren Bereich (zum Beispiel BR bei 568 nm).

Für das elektrophysiologische Aktionsspektrum spielen weitere Faktoren eine Rolle und können zu Unterschieden im Vergleich zum Absorptionsspektrum führen. Ein entscheidender Faktor ist zum Beispiel, dass das Opsin verschiedene Retinal-Konfigurationen binden könnte bzw. ein Gemisch im Grundzustand vorliegt. Wenn lediglich nur eine einzige Retinal-Konfiguration nach Lichtanregung zu einem effektiven Ionentransport führt, dann kann auch nur diese Spezies elektrophysiologisch als Aktionsspektrum gemessen werden.

1.6.2 Modifikation der Absorptionseigenschaften durch Retinal-Analoga

Die intrinsischen Absorptionseigenschaften der Rhodopsine lassen sich entweder durch Modifikation des Opsins selbst (siehe Abschnitt 1.5) oder durch Retinal-Analoga verändern. Neben synthetisch hergestellten Analoga können auch Retinal-Analoga verwendet werden, welche in der Natur vorkommen. Zu den natürlich vorkommenden Retinal-Analoga gehören das 3,4-Dehydroretinal, 3-Hydroxyretinal und das 4-Hydroxyretinal, welche in Abbildung 8 gezeigt sind. Diese ermöglichen Organismen die Anpassung ihrer Rhodopsine an verschiedene Lichtverhältnisse [110-114]. Interessanterweise wurden die natürlichen Retinal-Analoga bisher nur in tierischen Opsinen vom Typ-II (siehe Abschnitt 1.1) gefunden. Unter den mikrobiellen Rhodopsinen vom Typ-I wurden dagegen nur das all-*trans*-Retinal und dessen Isomere als Chromophor in der Natur nachgewiesen.

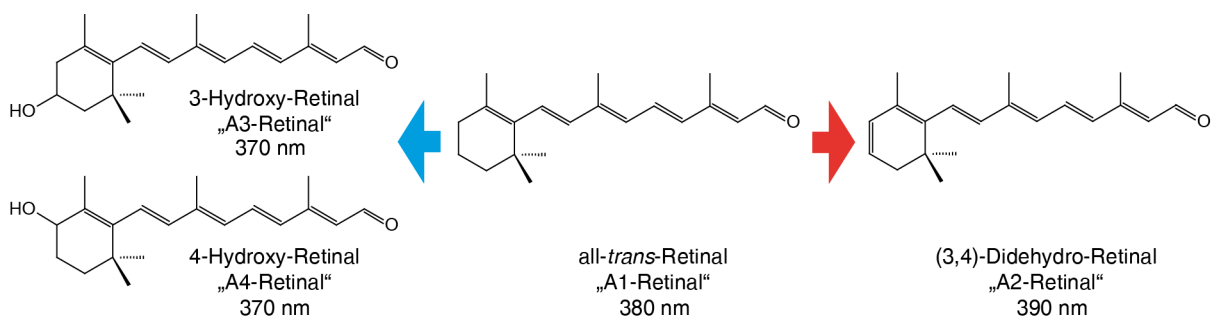


Abbildung 8: Übersicht über natürlich vorkommende Retinal-Derivate mit ihren verschiedenen Absorptionsmaxima.

Experimente mit Retinal-Analoga lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen:

1. Zu der ersten Kategorie gehören Experimente, bei welchen die Analoga mit aufgereinigten Protein bzw. mit opsinhaltigen Membranfraktionen rekonstituiert werden. Diese Rekonstituierungs-Experimente konnten zum Beispiel zeigen, dass natürliche Retinal-Analoga

grundsätzlich auch von Opsinen vom Typ-I gebunden werden können [115, 116]. Darüber hinaus konnte das Absorptionsmaximum von Bakteriorhodopsin mit synthetischen Retinal-Analoga um über 100 nm, sowohl in den blauen als auch roten Wellenlängenbereich, verschoben werden [117, 118]. Bei den genannten Experimenten zum „color-tuning“ mit mikrobiellen Rhodopsinen wurde in der Regel nicht getestet, ob die Opsine zusammen mit den Retinal-Analoga überhaupt noch funktional waren.

2. Die zweite Kategorie beinhaltet Experimente an nativen Zellen. So zeigten Experimente mit einem Retinal-defizienten Stamm der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, welche Phototaxis mit Hilfe von Kanalrhodopsinen durchführt, dass die Retinal-Analoga Verschiebungen im Aktionsspektrum der Phototaxis der Alge verursachen und daher auch Kanalrhodopsine binden [119, 120]. Elektrophysiologische Untersuchungen des Iontentransportes der mikrobiellen Rhodopsinen in nativen Membranen mit Retinal-Analoga fehlen bisher fast völlig. Die einzige Ausnahme ist eine Publikation aus der Gruppe von John L. Spudich mit dem natürlich vorkommenden (3,4)-Didehydroretinal [121]. Es wurde beobachtet, dass Kanalrhodopsine sowie die Pumpe Arch-3 funktional (3,4)-Didehydroretinal binden können, wobei die absoluten Stromamplituden reduziert waren. Die Aktionsspektren waren durch die Rekonstitution mit (3,4)-Didehydroretinal rot verschoben, wobei die Stärke der Rotverschiebung bei den untersuchten Rhodopsinen unterschiedlich ausgeprägt war.

Bisher existierten keine elektrophysiologischen Publikationen über mikrobielle Rhodopsine in nativen Zellen mit synthetischen Retinal-Analoga. Zudem war bisher unklar, ob neben (3,4)-Didehydroretinal auch die anderen natürlichen Retinal-Analoga als „optogenetische Tools“ verwendet werden können. In dieser Arbeit wurden genau diese offenen Fragen in Abschnitt 2.6 untersucht. Die Ergebnisse lieferten zusätzlich Einblicke in die Unterschiede zwischen Pumpen und Kanäle und waren somit auch für die Kernziele dieser Arbeit von Relevanz, welche im folgenden Abschnitt erläutert werden.

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Zu Beginn dieser Dissertation waren Protonenpumpen schon seit Jahrzehnten in der Wissenschaft bekannt. Insbesondere Bakteriorhodopsin gehört zu einem der am besten untersuchten Membranproteine überhaupt. Erstaunlicherweise waren die elektrophysiologischen Eigenschaften von Protonenpumpen unter Spannungskontrolle im Vergleich zu Kanalrhodopsinen kaum untersucht. Zudem gab es eine Reihe an Anzeichen, dass eine intensivere elektrophysiologische Untersuchung der Pumpen zu neuen Erkenntnissen führen könnte:

Hierzu zählen die Publikationen über das „*Green-Proteorhodopsin*“ [54, 55], welche erstmals von einwärts gerichteten Photoströmen bei Protonenpumpen berichteten. Die Amplituden von GPR waren jedoch gering und die Ergebnisse wurden von anderen Forschern kritisch betrachtet [57, 59]. Ein weiterer Aspekt war, dass für sensorische Rhodopsine eine schwache Pumpaktivität beschrieben wurde [122], obwohl Strukturelemente fehlten, welche in Bakteriorhodopsin für die Pumpaktivität elementar sind. Zudem war die Tatsache hoch interessant, dass Kanalrhodopsine und die Pumpen erstaunlich viele Ähnlichkeiten in der Aminosäure-Sequenz aufweisen, obwohl deren Funktionsweise eigentlich grundlegend verschieden sein sollte. Des Weiteren berichteten Feldbauer *et al.* über eine schwache Pumpaktivität auch in Kanalrhodopsinen [123].

All diese Beobachtungen führten zu zwei Thesen: Zuerst, dass Bakteriorhodopsin nicht mehr als universeller Repräsentant für alle lichtgetriebenen Protonenpumpen verwendet werden sollte, weil vermutlich verschiedene Klassen an lichtgetriebenen Protonenpumpen existieren. Zweitens, dass Pumpen und Kanalrhodopsine grundsätzlich eine hohe Verwandtschaft aufweisen und dass nur einzelne Strukturbestandteile für die funktionellen Unterschiede entscheidend sind. Die experimentelle Untersuchung dieser beiden Thesen bildete die Motivation zu dieser Dissertation.

Das Ziel dieser Dissertation war es daher, potentiell interessante Protonenpumpen zu identifizieren, um diese anschließend elektrophysiologisch detaillierter zu untersuchen. Zudem wurde angestrebt bekannte Schlüsselpositionen in den Protonenpumpen zu mutieren, weil die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Mutanten selbst für Bakteriorhodopsin kaum oder gar nicht bekannt waren. Ein besonderes Interesse richtete sich hierbei auf die pH- und Spannungsabhängigkeit der Protonenpumpen. Darauf aufbauend wurde beabsichtigt die Strukturbestandteile zu identifizieren, welche für die Unterschiede zwischen Pumpen und Kanälen verantwortlich sein könnten. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Retinal-Analoga beabsichtigt, die spektralen Eigenschaften von Rhodopsinen zu modifizieren.

2 Ergebnisse

2.1 Photoströme mikrobieller Rhodopsine in Oozyten

In bisherigen Publikationen wurden die Photoströme jeweils einzelner Rhodopsine untersucht. Es fehlte ein systematischer Vergleich, weswegen in dieser Arbeit ausgewählte Rhodopsine unter vergleichbaren Bedingungen untersucht wurden. Hierdurch sollte ein Überblick über die elektrophysiologischen Eigenschaften unter identischen Bedingungen gewonnen werden.

2.1.1 Photoströme der Ionenpumpen

2.1.1.1 Übersicht über die Stromkurven von Ionenpumpen

Eine Auswahl an Protonenpumpen, zusammen mit der Chloridpumpe NpHR, wurde in Oozyten aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* elektrophysiologisch untersucht. In Abbildung 9 sind repräsentative lichtabhängige Stromspuren dieser Ionenpumpen gezeigt. Eine Übersicht über alle getesteten Rhodopsine ist in Tabelle 2 aufgeführt. Alle Messungen wurden unter Verwendung des Oozyten-Standardpuffers „Na 7.5“ mit 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM MgCl₂ und pH=7.5 (5 mM MOPS, mit NaOH eingestellt) durchgeführt. Alle weiteren Oozyten-Messungen wurden ebenfalls im Standard-Puffer durchgeführt, wenn keine weiteren Angaben aufgeführt sind. Die Tabelle 4 im Anhang zeigt die genaue Zusammensetzung aller Messpuffer für die Oozyten-Messungen.

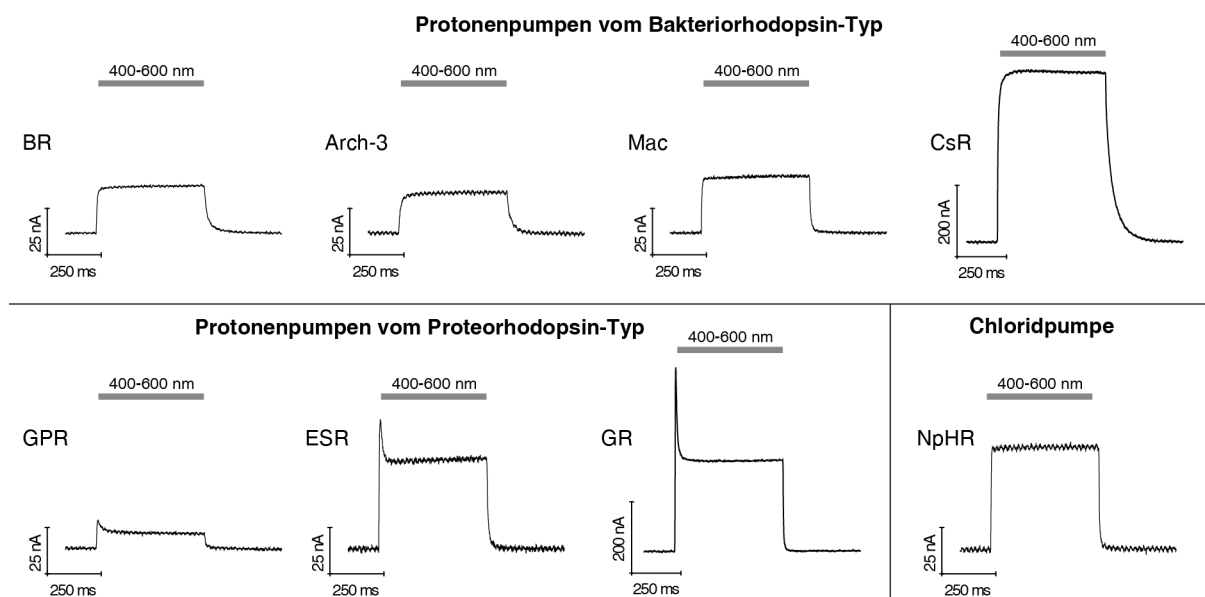


Abbildung 9: Stromkurven mikrobieller Ionenpumpen in Oozyten. Die Oozyten wurden nach 4 Tagen Expression bei einer Haltespannung von 0 mV in „NaCl 7.5“-Puffer gemessen (die genaue Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 4 aufgeführt). Die Belichtung erfolgte für je 500 ms mit Licht der Wellenlänge von 400-600 nm. Die gezeigten Stromkurven entsprechen den durchschnittlichen Stromamplituden. Eine Ausnahme ist die Stromspur von GPR, weil GPR die niedrigsten Amplituden aufweist, so dass hier eine Messung von GPR mit überdurchschnittlich hohen Amplituden gezeigt ist.

Wie erwartet zeigen alle Ionenpumpen positive Photoströme. Die Belichtung der Ionenpumpen in Abbildung 9 erfolgte mit einem Breitbandfilter, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 400-600 nm passieren lässt (die Transmissionsspektren der Breitbandfilter sind im Anhang in Abbildung 74 gezeigt). Die ersten vier gezeigten Protonenpumpen gehören aufgrund ihrer Sequenz-Ähnlichkeit zu den Protonenpumpen vom BR-Typ. Bakteriorhodopsin wurde als Kontrolle und Referenz in die

Messungen mit einbezogen. Arch-3 und Mac wurden aufgrund ihrer Bedeutung in der Optogenetik ausgewählt [48, 83]. Das *Coccomyxa*-Rhodopsin stammt aus der arktischen Alge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 [68] und wurde bisher weder spektroskopisch noch elektrophysiologisch untersucht. Sowohl Arch-3, Mac als auch CsR zeigen Photoströme, deren Form und Kinetik der von Bakteriorhodopsin entspricht. Auffällig ist, dass die absoluten Stromamplituden von CsR ein Vielfaches größer sind als die der anderen Protonenpumpen.

Im Gegensatz zu den Protonenpumpen vom BR-Typ weisen die Protonenpumpen vom PR-Typ eine eigene charakteristische Form auf. Auffällig sind hier ein deutlicher transienter Strom und ein allgemein schnelleres kinetisches Profil. GR und ESR wurden in dieser Arbeit erstmalig elektrophysiologisch untersucht. Unter den Protonenpumpen vom PR-Typ zeigte GR die größten Stromamplituden. Die Chloridpumpe NpHR zeigte in Oozyten stationäre Photoströme ohne transiente Ströme und bestätigte frühere Experimenten von Seki *et al.* [50]. Interessanterweise zeigte NpHR eine *off*-Kinetik wie die Proteorhodopsine.

GPR wurde in allen nachfolgenden Experimenten nicht mit einbezogen, weil diese Protonenpumpe nur kleine Stromamplituden in Oozyten aufweist und bereits in früheren Arbeiten intensiver untersucht wurde [54, 55]. Die Protonenpumpen Xanthorhodopsin und Actinorhodopsin zeigten unter verschiedensten Messbedingungen keine Photoströme, weswegen diese Protonenpumpen ebenfalls nicht weiter experimentell untersucht wurden [60, 61, 124].

2.1.1.2 Aktionsspektren der Protonenpumpen

Die Spektren der hier untersuchten Ionenpumpen waren bisher im Oozyten-System völlig unbekannt. Deswegen wurden die Aktionsspektren bestimmt und sind in Abbildung 10 gezeigt.

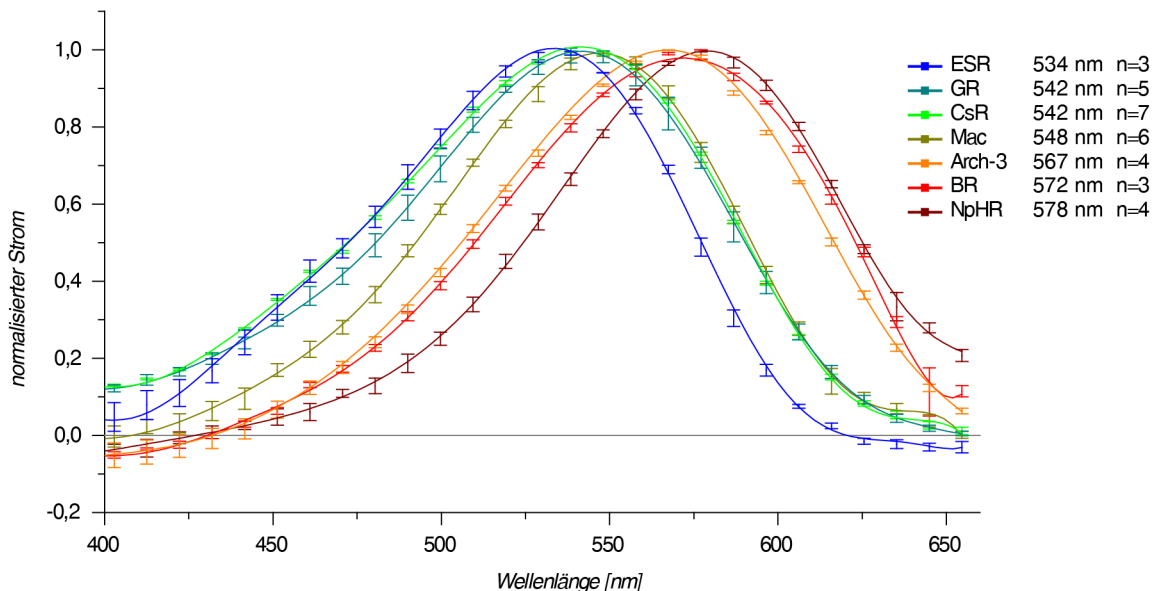


Abbildung 10: Aktionsspektren der untersuchten Ionenpumpen in Oozyten. Hierfür wurden die stationären Ströme ausgewertet, welche bei Belichtung der Oozyten mit Licht von 400-600 nm beobachtet wurden (0 mV Haltespannung und je 300 ms Belichtung). Alle Daten sind als $\text{mean} \pm \text{SE}$ angegeben.

Die untersuchten Ionenpumpen zeigen Aktionsmaxima im Bereich von 530 nm bis 580 nm und die Form der Spektren ist typisch für Rhodopsine. Die bisher in der Literatur beschriebenen

Aktionsmaxima (Mac: 550 nm in Neuronen, Arch-3: 566 nm in Neuronen, BR: 572 nm in Neuronen und NpHR: 580 nm in Oozyten) stimmen im Wesentlichen mit den eigenen Werten überein [48, 82].

Bei der Belichtung der Oozyten mit einem Breitbandfilter von 400-600 nm können sekundäre Photoreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der gemessenen Aktionsspektren konnten geeignete Filter für die nachfolgenden Experimente ausgewählt werden. Der 550 ± 25 nm-Filter (Abbildung 74) deckt den Bereich der meisten Rhodopsine sehr gut ab und zeigt zugleich von allen Breitbandfiltern die höchste Transmission. Deswegen wurde dieser Filter im Folgenden für CsR, Mac, Arch-3 und BR verwendet.

Bei ESR waren die absoluten Stromamplituden klein und die Maxima lagen bei circa 530 nm, weswegen der 400-600 nm-Filter eingesetzt wurde. Auch für GR wurde in den nachfolgenden Experimenten der 400-600 nm-Filter verwendet, weil einige GR-Mutanten Verschiebungen im Aktionsspektrum zeigten und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den GR-Varianten angestrebt wurde.

2.1.1.3 Strom-Spannungs-Messungen der Protonenpumpen bei unterschiedlichen Spannungen und pH_o -Bedingungen

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Untersuchung der Protonenpumpen bei verschiedenen elektrochemischen Gradienten. Daher wurden die Protonenpumpen bei unterschiedlichen Spannungen und verschiedenen extrazellulären pH-Bedingungen (pH_o) in Oozyten getestet.

Die daraus resultierenden lichtabhängigen Stromspuren und Strom-Spannungs-Plots (IV-Plots) sind in den Abbildungen 11 und 12 gezeigt. Von den hier untersuchten Protonenpumpen wurde bisher nur BR bei unterschiedlichen Spannungen und extrazellulären pH-Werten in nativen Membranen bei kontrollierten Membranspannungen untersucht. Diese bisherigen publizierten Messungen, vor allem in Geibel *et al.* 2001 [40], erfolgten jedoch nur im pH_o -Bereich von 5.5 bis 8.5 und deckten damit einen kleineren Messbereich als in dieser Arbeit ab.

Für Bakteriorhodopsin wurde hier und in allen weiteren Experimenten dieser Arbeit eine Variante von BR verwendet, welche am C-Terminus mit der β -Untereinheit einer H,K-ATPase fusioniert war. Geibel *et al.* konnten mit dieser BR-Variante vierfach höhere Stromamplituden in HEK293-Zellen beobachten [40, 125]. Die eigenen Experimente in Oozyten ergaben für BR ohne β -Untereinheit Stromamplituden in Höhe von 49 ± 7 nA ($n=19$), während diese mit β -Untereinheit bei 66 ± 7 nA ($n=17$) lagen (bei +75 mV und Standardpuffer, Angaben als $\text{mean}\pm\text{SE}$, siehe ergänzend Abbildung 17).

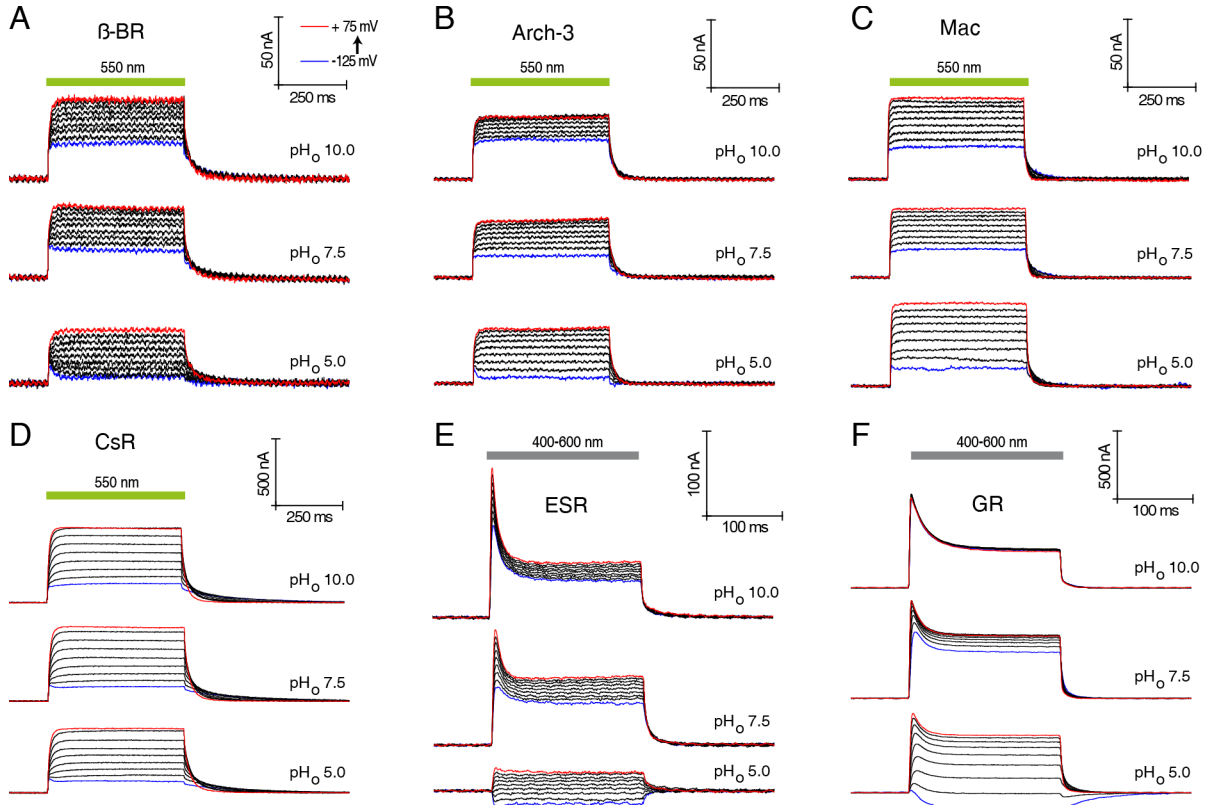


Abbildung 11: Überblick über die Stromspuren ausgewählter Protonenpumpen in Oozyten. Alle Photoströme wurden jeweils in 25 mV Schritten beginnend bei -125 mV bis +75 mV bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten gemessen. Zu beachten ist, dass sich die Zeit- und Photostrom-Skalen unterscheiden.

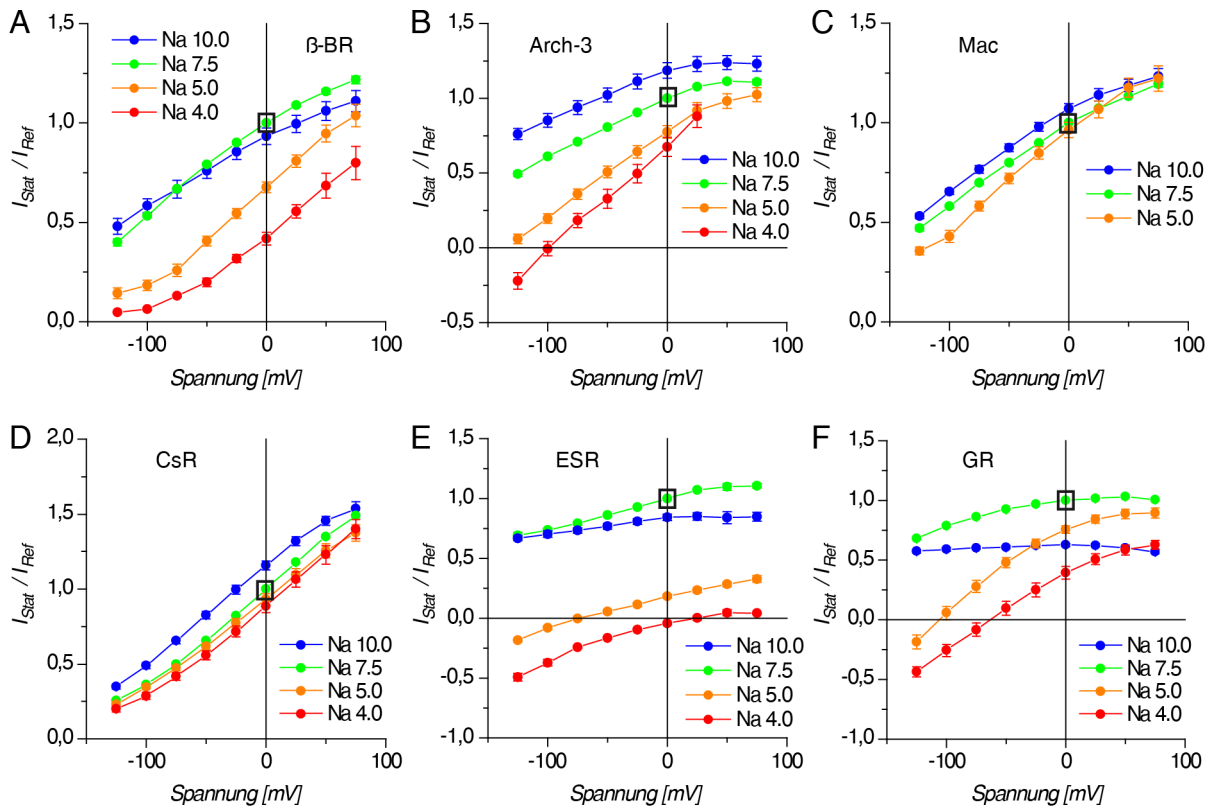


Abbildung 12: Auswertung der stationären Photoströme aus Abbildung 11. Hierfür wurden die Einzelmessungen normiert und zusammengefasst. Die Normierung ist für jeden Plot mit einer schwarzen Box gekennzeichnet (0 mV und $pH_o=7.5$). Die Angabe der n-Werte erfolgt in der Reihenfolge $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{BR}=[8/17/5-10/6]$, $n_{Arch-3}=[8/17/8/8]$, $n_{Mac}=[8/14/10/0]$, $n_{CsR}=[10/34/7/8]$, $n_{ESR}=[9/16/6/3]$ und $n_{GR}=[9/26/8/10]$. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Erstaunlicherweise zeigten alle sechs Protonenpumpen sehr unterschiedliche Spannungs- und pH-Abhängigkeiten. Eigentlich wurden die gleichen Spannungs- und pH_0 -Abhängigkeiten wie bei BR erwartet. Im Folgenden werden die wichtigsten Beobachtungen zusammengefasst:

Bakteriorhodopsin: Auffällig an Bakteriorhodopsin im hier gemessenen Messbereich ist, dass die Ströme bei negativen Spannungen und niedrigen extrazellulären pH-Werten eindeutig abnehmen bzw. inaktivieren. In der Arbeit von Geibel *et al.* [40] wurde die Inaktivierung zwar auch schon bei $\text{pH}_0=5.5$ beobachtet, aber in deutlich schwächerer Ausprägung. Ebenfalls interessant ist, dass bei sehr basischen Bedingungen und positiven Spannungen die Stromamplituden gegenüber den Strömen bei $\text{pH}_0=7.5$ schwächer werden. Dieser Trend zeigte sich ebenfalls in der Arbeit von Geibel *et al.*, jedoch wird diese Abschwächung der Amplituden erst bei $\text{pH}_0=10$ eindeutig erkennbar.

Archaeorhodopsin-3: Die Protonenpumpe Arch-3 (BR-Typ) zeigt ein deutlich anderes Verhalten als BR. Am auffälligsten ist, dass der Photostrom bei $\text{pH}_0=4.0$ und negativen Spannungen negativ wird. Diese Beobachtung wurde kürzlich in der Publikation von Inoue *et al.* 2015 bestätigt [126].

Mac und CsR: Diese beiden Protonenpumpen (BR-Typ) ähneln sich weitgehend und sind durch eine besonders geringe pH_0 -Abhängigkeit gekennzeichnet. CsR hat eine leicht erhöhte Spannungsabhängigkeit gegenüber Mac und den anderen Protonenpumpen. Die Stromamplituden von CsR vergrößerten sich bei $\text{pH}_0=7.5$ im untersuchten Spannungsbereich um das 5-fache, während sich die Amplituden der anderen Protonenpumpen nur um das 3-fache vergrößerten.

ESR und GR: Von allen untersuchten Protonenpumpen zeigen ESR und GR (PR-Typ) die auffälligsten Stromkurven, da diese einwärts gerichtete Photoströme bei hohen elektrochemischen Gradienten zeigen. Darüber hinaus ist die Verringerung der Stromamplituden bei $\text{pH}_0=10$ gegenüber $\text{pH}_0=7.5$ sehr deutlich ausgeprägt, welche grundsätzlich auch bei BR, aber in deutlich schwächerer Ausprägung zu beobachten war. Des Weiteren kommt hinzu, dass ESR und GR offenbar bei $\text{pH}_0=7.5$ und $\text{pH}_0=10$ nur noch eine geringe bis überhaupt keine Spannungsabhängigkeit zeigen. Eine weitere Eigenheit von ESR und GR ist der sehr stark ausgeprägte transiente Peak-Strom.

2.1.1.4 Spannungsabhängigkeit der Protonenpumpen

Im vorherigen Abschnitt wurde festgestellt, dass sich die Protonenpumpen in ihren Spannungs- und pH_0 -Abhängigkeiten deutlich unterscheiden. Die genauen Gründe für die Unterschiede zwischen den Protonenpumpen sind unbekannt. Deswegen werden im Folgenden die Daten aus den Abbildungen 11 und 12 differenzierter ausgewertet, um mehr Informationen gewinnen zu können.

Einer der größten Auffälligkeiten der Protonenpumpen ist, dass die Spannungsabhängigkeit offenbar unabhängig vom pH_0 -Wert sein kann. Zum Beispiel zeigte CsR die größte Spannungsabhängigkeit, obwohl die pH_0 -Abhängigkeit vergleichsweise sehr gering war. Um diese verschiedenen Spannungsabhängigkeiten besser darzustellen, wurde die Steigungen der Strom-Spannungskurven der Protonenpumpen aus Abbildung 12 durch lineare Fits bestimmt. Hierfür wurden nur die Messpunkte von -75 mV bis +25 mV verwendet, weil die untersuchten Protonenpumpen bei sehr negativen und positiven Spannungen keine lineare Abhängigkeit mehr zeigten. Abbildung 13A demonstriert die Bestimmung der Steigungen exemplarisch am IV-Plot von Arch-3. Hierbei ist zu beachten, dass die Steigungen allein die Spannungsabhängigkeiten darstellen. Direkte Rückschlüsse

auf die Pumpkraft sind hiermit nicht möglich. Die Steigungen der Strom-Spannungskurven bei verschiedenen pH_o -Bedingungen sind in Abbildung 13B zusammengefasst.

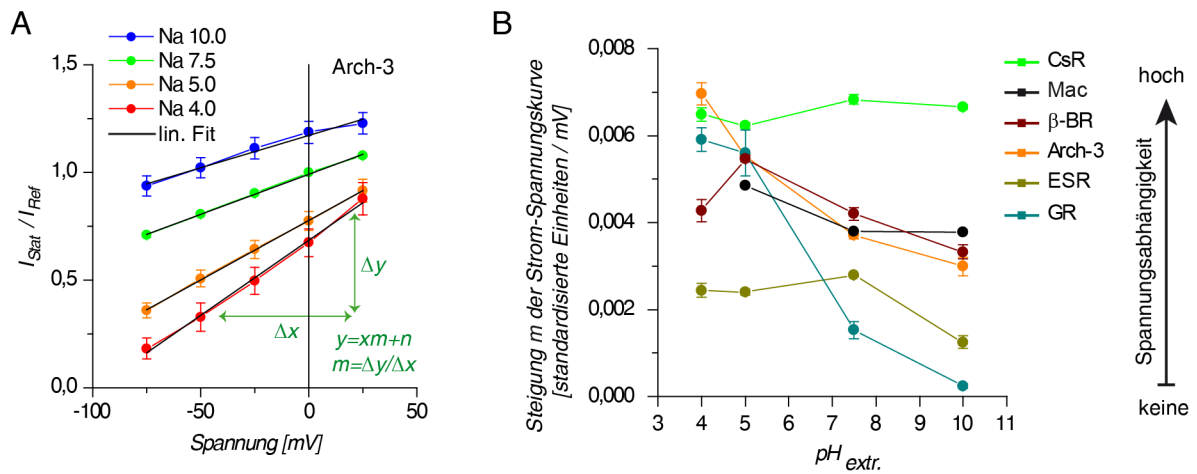


Abbildung 13: Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme. Hierfür wurde die Steigung der Strom-Spannungskurven aus Abbildung 12 im Bereich von -75 mV bis +25 mV durch linearen Fit bestimmt. In Teilabbildung A ist die Bestimmung der Steigungen exemplarisch an Arch-3 gezeigt. Teilabbildung B zeigt die zusammengefassten Ergebnisse für alle Protonenpumpen. Eine Steigung von $m=0$ bedeutet, dass die Photoströme spannungsunabhängig sind. Die linearen Fits sowie deren Standardfehler wurden mit der Software Origin bestimmt.

Die genauere Auswertung der Daten bestätigt, dass CsR die größte Spannungsabhängigkeit aufweist und dass diese zugleich unabhängig vom extrazellulären pH -Wert ist. Bei GR ist die Spannungsabhängigkeit dagegen am stärksten vom pH_o -Wert abhängig. Die anderen Pumpen weisen sowohl Eigenschaften von CsR als auch von GR auf. Interessant ist, dass sich ESR und GR offenbar untereinander mehr unterscheiden als Abbildung 11 auf den ersten Blick suggeriert. So zeigt ESR generell eine geringe Spannungsabhängigkeit, welche auch nur schwach vom pH_o -Wert abhängig ist.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Spannungsabhängigkeit und die pH_o -Abhängigkeit der Protonenpumpen nicht miteinander gekoppelt sein müssen und unabhängig voneinander auftreten können. Andererseits kann durchaus eine deutliche Spannungs- und pH_o -Abhängigkeit gleichzeitig auftreten.

2.1.1.5 Die elektrochemische Kraft der Protonenpumpen

In den vorherigen Abschnitten wurde festgestellt, dass sich die Photoströme der Protonenpumpen bei Variation des elektrochemischen Gradienten unterschiedlich verhalten. Demnach liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch die jeweilige protonenmotorische Kraft der Protonenpumpen unterschiedlich ist (PMF, siehe Abschnitt 1.2.2). In elektrophysiologischen Messungen lässt sich die PMF eines Protonentransporters über das Umkehrpotential E_{rev} bestimmen. Die Differenz zwischen den gemessenen Umkehrpotentialen und den theoretischen Umkehrpotentialen für einen rein passiven Protonentransport ergibt die protonenmotorische Kraft in mV. Die jeweiligen Werte für E_{rev} eines rein passiven Transporters lassen sich direkt über die Nernst-Gleichung bestimmen, da sowohl die extrazellulären pH -Werte als auch der intrazelluläre pH -Wert von circa 7,4 für Oozyten bekannt sind [127]. Abbildung 14A zeigt zur Veranschaulichung die theoretischen Umkehrpotentiale in einem Strom-Spannungsdiagramm eines rein passiven Protonentransporters bei unterschiedlichen extrazellulären pH -Werten. Die Umkehrpotentiale der Protonenpumpen sind durch ihren aktiven Transport von Protonen zu negativeren Spannungen verschoben.

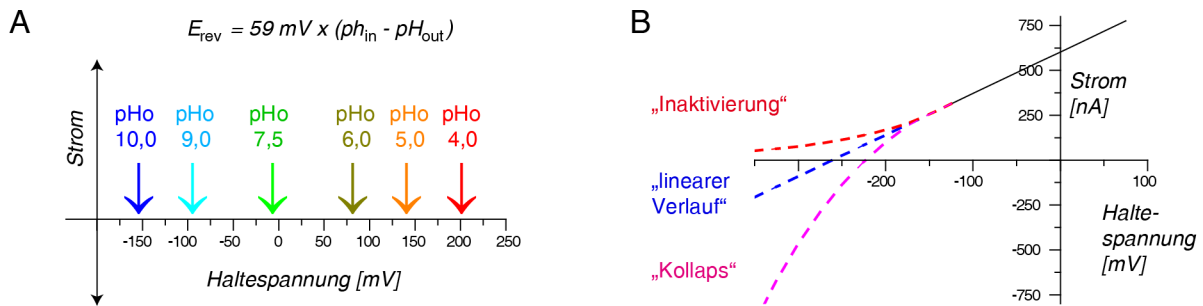


Abbildung 14: Abbildungen zum Verständnis der folgenden Analysen und Experimente. A: Theoretische Umkehrpotentiale eines idealen passiven Protonentransporters in Oozyten bei verschiedenen elektrochemischen Gradienten (Variation der pH_o-Werte und der Haltespannung). Die Umkehrpotentiale eines solchen passiven Transporters wären im pH_o-Bereich von 6.0 bis 9.0 und bei Haltespannungen von -125 bis +75 mV direkt messbar. B: Gezeigt ist die Problematik der Umkehrpotential-Bestimmung im Falle der experimentellen Daten. Die Umkehrpotentiale liegen außerhalb des messbaren Bereiches, weswegen die Umkehrpotentiale extrapoliert werden müssen. Hierfür sind verschiedene potentielle Kurvenverläufe denkbar, welche als gestrichelte Linien gezeigt sind.

Im Falle der Protonenpumpen ergibt sich jedoch das Problem, dass die Umkehrpotentiale nicht mehr im messbaren Bereich liegen und extrapoliert werden müssen. Im Idealfall sollte sich das Umkehrpotential durch lineare Extrapolation der Strom-Spannungsabhängigkeit bestimmen lassen. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen zeigten die Daten aus den vorherigen Abschnitten, dass die Protonenpumpen offenbar auch nicht-lineare Strom-Spannungsabhängigkeiten aufweisen. Daher kann der Verlauf der Photoströme in der Nähe der Umkehrpotentiale nur abgeschätzt werden und der dadurch bedingte Fehler muss in Kauf genommen werden. Abbildung 14B zeigt drei mögliche Verläufe der Strom-Spannungskurven in der Nähe der Umkehrpotentiale.

Der Typ „Inaktivierung“ entspricht dem Verhalten der Photoströme von BR. In diesem Fall existieren Umkehrpotentiale nur hypothetisch, welche durch lineare Extrapolation unter der Vernachlässigung der Inaktivierung bestimmt werden können. Dagegen entspricht der Typ „linearer Verlauf“ dem Idealfall, um Umkehrpotentiale durch Extrapolation zu bestimmen. Der dritte Typ „Kollaps“ entspricht dem Verhalten von ESR und GR. Bei niedrigen pH_o-Werten sind hier die Umkehrpotentiale direkt aus den Messungen ohne Extrapolation bestimmbar.

Die Abbildungen 15A und B veranschaulichen die Bestimmung der Umkehrpotentiale am Beispiel der experimentellen Daten von BR und GR. Insbesondere im Fall von BR bei pH_o=4.0 wird deutlich, dass die Extrapolation rein theoretisch ist und dass wahrscheinlich aufgrund der Inaktivierung nie eine Umkehr der Photoströme erfolgen würde. Im Falle von GR und ESR ergibt sich ein weiterer Grenzfall. Hier ist die Bestimmung der Umkehrpotentiale bei pH_o=10 durch Extrapolation nicht möglich, weil der Kurvenverlauf bei negativeren Spannungen als -125 mV völlig unklar ist. Abbildung 15C zeigt zusammengefasst die Umkehrpotentiale der untersuchten Protonenpumpen. Die Werte wurden entweder direkt durch linearen Fit oder durch lineare Extrapolation der Messpunkte zwischen -125 mV und -75 mV bestimmt. Zusätzlich ist der Messbereich mit gestrichelten Linien gekennzeichnet, in welchem die Umkehrpotentiale direkt bestimmt werden konnten. Als Referenz ist der theoretische Verlauf der Umkehrpotentiale eines rein passiven Protonentransporters mit eingetragen (identisch zu Abbildung 14A).

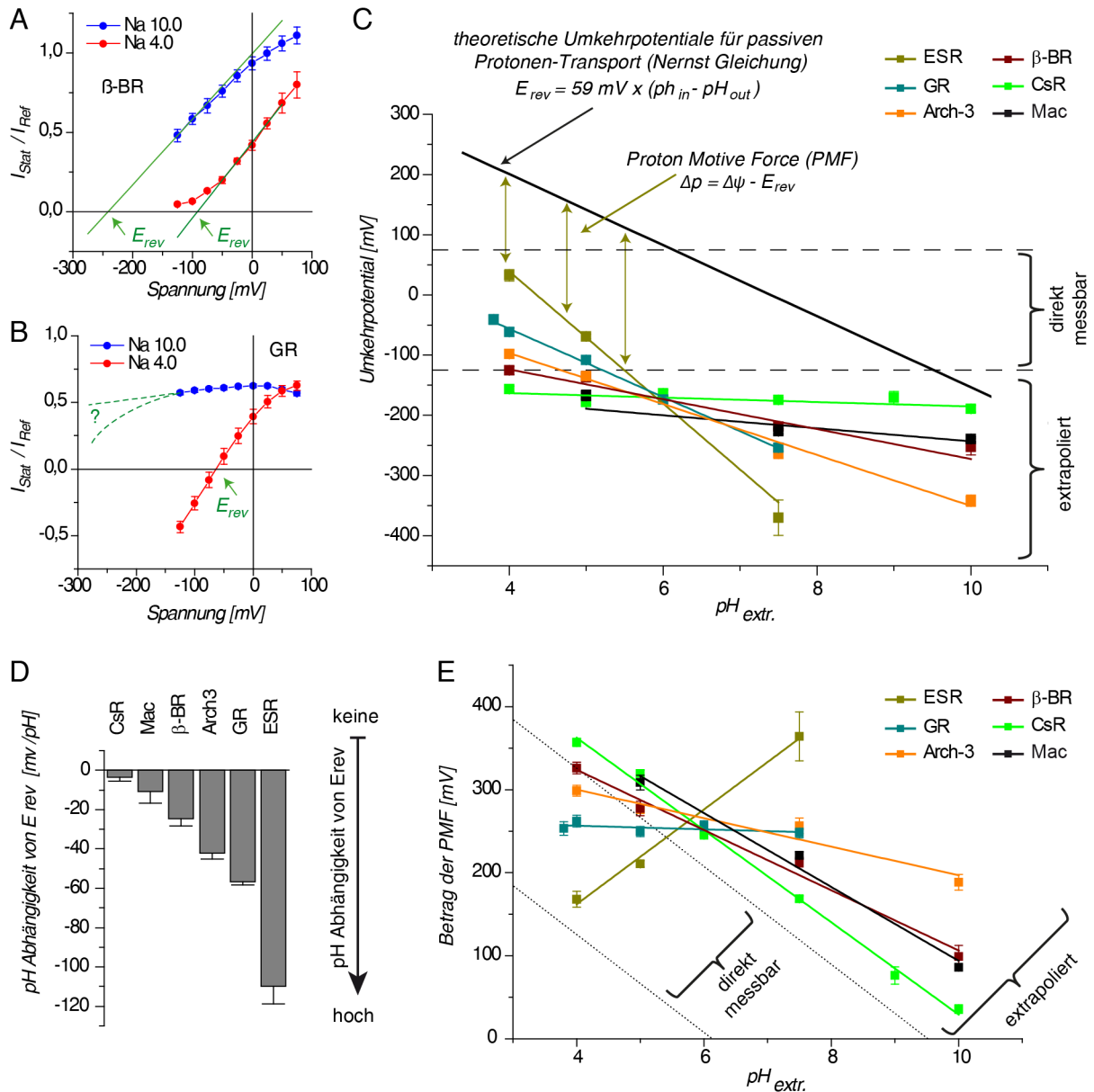


Abbildung 15: Die Umkehrpotentiale und die Protonenmotorischen Kraft der Protonenpumpen. A-B: Bestimmung der Umkehrpotentiale (E_{rev}) am Beispiel von BR und GR (Daten aus Abbildung 12). C: Umkehrpotentiale bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. Hierfür wurde bei jeder Einzelmessung das Umkehrpotential durch lineare Extrapolation bestimmt. Anschließend wurden die Umkehrpotentiale aus den Einzelmessungen gemittelt und deren Standardfehler berechnet. D: pH_o -Abhängigkeit der Umkehrpotentiale. Die Werte wurden durch linearen Fit der Steigungen aus Teilabbildung C bestimmt. Die Fehler entsprechen dem Standardfehler und wurden mit der Software Origin bestimmt. E: Grafische Darstellung der Protonenmotorischen Kräfte (PMF) in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Die Werte ergeben sich aus Teilabbildung C. Zur besseren Veranschaulichung ist die PMF als Betrag angegeben. $pH_o = [10/7.5/5/4]$ mit $n_{BR} = [8/17/10/7]$, $n_{Arch-3} = [8/17/8/5]$, $n_{Mac} = [8/14/10/0]$ und $n_{ESR} = [0/14/8/4]$, bei CsR $pH_o = [10/9/7.5/6/5/4]$ mit $n = [8/3/35/5/8/8]$, bei GR $pH_o = [7.5/6/5/4/3.8]$ mit $n = [23/6/9/10/3]$.

Aus Abbildung 15C lassen sich folgende Informationen gewinnen:

1. Die Umkehrpotentiale aller untersuchten Protonenpumpen sind negativer als die eines passiven Transporters. Daher sind alle Protonenpumpen, wie erwartet, auswärts gerichtete aktive Protonentransporter.
2. GR und ESR zeigen auch bei niedrigen extrazellulären pH-Werten eine auswärts gerichtete Pumpaktivität. Dies ist nicht selbstverständlich, weil unter diesen Bedingungen negative stationäre Photoströme gemessen wurden.

3. Die Umkehrpotentiale folgen offenbar einer linearen Abhängigkeit. Die Steigungen dieser linearen Abhängigkeiten weichen im Einzelnen von der theoretisch erwarteten Steigung der passiven Protonenleitung ab.

Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen pH_o -Abhängigkeiten wurden die Steigungen der Umkehrpotentiale in Abbildung 15C durch lineare Fits bestimmt und in Abbildung 15D dargestellt. Die Steigung repräsentiert die Verschiebung des Umkehrpotentials, wenn sich der extrazelluläre pH-Wert um eine pH-Einheit ändert. Entsprechend der Nernst-Gleichung würde die Änderung des Umkehrpotentials (=Steigung) bei einem passiven Protonentransporter -59 mV/pH betragen (siehe Abbildung 4).

Die eigenen experimentellen Ergebnisse für BR in Abbildung 15D ergaben $-25 \pm 4 \text{ mV/pH}$ als Steigung und bestätigt damit die früheren Ergebnisse von Geibel *et al.* [40] mit -34 mV/pH (siehe Stichpunkt 4 in Abschnitt 1.2.2). Dagegen sind die Umkehrpotentiale von CsR fast unabhängig vom pH_o -Wert. Interessanterweise liegt nur die Steigung von GR genau bei -59 mV pro pH-Einheit, weswegen die Umkehrpotentiale in Abbildung 15C von GR-WT auch genau parallel zu den theoretischen Umkehrpotentialen für rein passiven Protonentransport verlaufen.

In Abbildung 15E ist die pH_o -Abhängigkeit der Protonenmotorischen Kraft (PMF) der Protonenpumpen gezeigt. Die Werte ergeben sich ebenfalls direkt aus Abbildung 15C. Aufgrund der unterschiedlichen Umkehrpotentiale der Protonenpumpen sind auch die Werte für die PMF unterschiedlich. Die PMF der auswärts gerichteten Protonenpumpen ist per Definition negativ [26], jedoch sind die PMFs zur besseren Anschaulichkeit in Abbildung 15E als Beträge dargestellt.

Beim direkten Vergleich von Abbildung 15C mit Abbildung 15E werden die Unterschiede zwischen den Umkehrpotentialen und den PMF-Werten deutlich. So sind die Umkehrpotentiale von GR zwar pH_o -abhängig, jedoch ist die PMF von GR mit 260 mV unter den gemessenen Bedingungen pH_o -unabhängig. Im Gegensatz dazu sind die Umkehrpotentiale von CsR unabhängig vom pH_o -Wert, wodurch die daraus berechneten PMF-Werte pH_o -abhängig werden. Interessanterweise ist die PMF von CsR im Vergleich zu allen anderen untersuchten Protonenpumpen bei niedrigen pH_o -Werten die höchste und bei hohen pH_o -Werten die niedrigste. ESR nimmt eine Sonderrolle ein, weil sich die PMF von ESR genau gespiegelt zu CsR verhält. Bis auf ESR nehmen die anderen Protonenpumpen eine Zwischenstellung zwischen CsR und GR ein. Die eigenen experimentellen Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass die PMFs von Protonenpumpen in unterschiedlicher Ausprägung pH_o -abhängig sind.

Trotzdem muss bei der Betrachtung der PMF weiterhin beachtet werden, dass die meisten Werte außerhalb vom direkt messbaren Bereich liegen und die lineare Extrapolation dabei zunehmend ungenau wird. Würde das Verhalten von ESR bis zu $\text{pH}_o=0.0$ linear extrapoliert werden, dann würde dies bedeuten, dass ESR bei $\text{pH}_o=0.0$ zu einem aktiven Protonentransporter wird, welcher Protonen von außen nach innen pumpt.

Interessanterweise sind die Umkehrpotentiale der Pumpen alle bei $\text{pH}_o=6.0$ mit circa $E_{\text{rev}} = -160 \text{ mV}$ bzw. einer ΔPMF von 260 mV ähnlich. Es ist unklar, ob und in wie weit diese Beobachtung eine Bedeutung hat.

2.1.2 Stromamplituden von mikrobiellen Rhodopsinen

Die Untersuchung der Protonenpumpen im vorherigen Abschnitt hat gezeigt, dass GR und ESR bei negativen Spannungen und niedrigen extrazellulären pH-Werten einwärts gerichtete Ströme zeigen. Dieses Verhalten war unerwartet und wirft die Frage auf, wie ähnlich Protonenpumpen und Kanalrhodopsine sind und was diese letztendlich auf molekularer Ebene unterscheidet bzw. vereint. Insbesondere ChR2 dient als Modellprotein, um die Funktionsweise von Kanalrhodopsinen zu verstehen. Abbildung 16 zeigt typische Stromspuren von ChR1 und ChR2-T159C als Beispiele für Stromkurven der Kanalrhodopsine. Auf eine detaillierte Charakterisierung dieser Kanalrhodopsine wird hier verzichtet, weil diese in früheren Arbeiten bereits in Oozyten untersucht wurden [71].

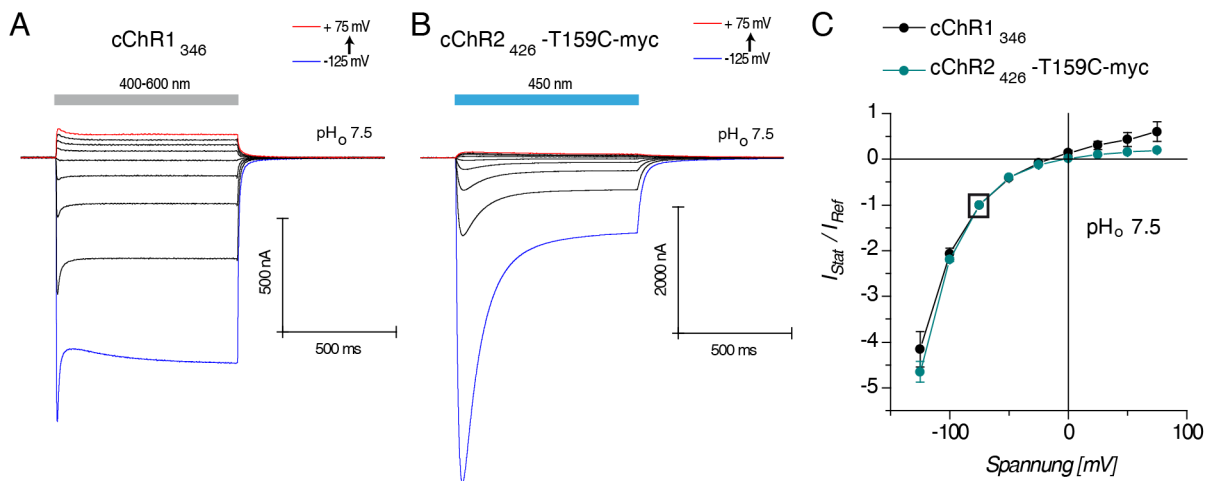


Abbildung 16: Die Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2 in Oozyten. Alle Messungen erfolgten bei pH_o=7.5 mit einer Belichtung für 800 ms. A: Repräsentative Stromkurven. Es sind Messungen gezeigt, welche den mittleren Amplituden in Oozyten entsprechen. B: Für das Strom-Spannungsdiagramm wurden nur die stationären Ströme ausgewertet (cChR1 mit n=5, cChR2-TC mit n=16). Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Beim Vergleich der auswärts gerichteten stationären Stromamplituden der hier gezeigten Kanäle und Pumpen aus Abbildung 9 fällt auf, dass die Amplituden von CsR und GR deutlich größer als die Amplituden der Kanäle sind. Für die Kanäle wurden höhere Ströme bei positiven Spannungen erwartet, weil diese theoretisch mehrere Ladungen pro Photozyklus transportieren könnten. Abbildung 17 veranschaulicht diese Beobachtung, indem die absoluten stationären Stromamplituden der Protonenpumpen und Kanalrhodopsinen bei +75 mV und physiologischen pH_o-Bedingungen gezeigt sind. Es fällt sofort auf, dass die Photostromamplituden von GR und CsR im Median signifikant über denen der Kanalrhodopsine liegen (pH_o=7.5, 100 mM NaCl, +75 mV).

Im Gegensatz dazu entspricht der Amplitudenunterschied um den Faktor von 2-3 zwischen ChR2-WT und ChR2-T159C den Erwartungen (sowohl beim humanisierten „codon usage“ als auch beim natürlichen „codon usage“ von *C. reinhardtii*), denn es ist bekannt, dass durch die T159C-Mutation die Amplituden von ChR2 erhöht werden [94, 95]. Interessanterweise konnte ein Unterschied zwischen einem Volllängenkonstrukt eines Kanals (cChR2-full) und der verkürzten Variante (cChR2₁₋₄₂₆myc) festgestellt werden. Diese interessante Beobachtung widerspricht der Literatur [70], aber konnte aus Prioritätsgründen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiterverfolgt werden.

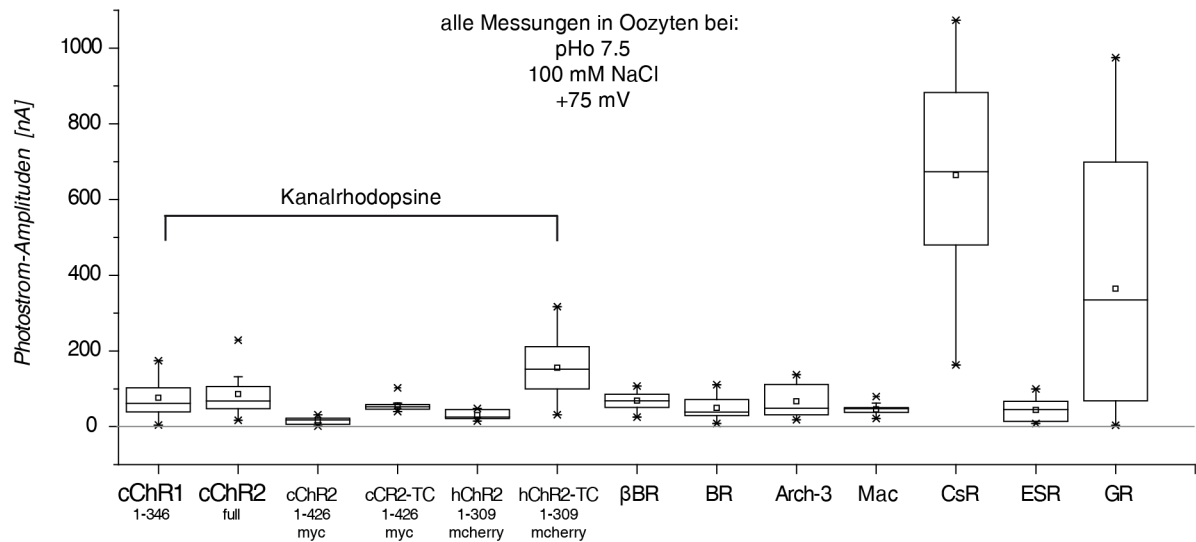


Abbildung 17: Amplituden von verschiedener Kanälen und Protonenpumpen in Oozyten. Gezeigt sind die absoluten stationären positiven Stromamplituden als Box-Chart-Diagramm bei pH_o=7.5 und einer Haltespannung von +75 mV. cChR1₁₋₃₄₆ (400-600 nm, 2 Frösche, n=5), cChR2₁₋₇₃₇ „full“ (450 nm, 2 Frösche, n=9), cChR2_{1-426myc} (450 nm, 3 Frösche, n=12), cChR2-TC_{1-426myc} (450 nm, 4 Frösche, n=16), hChR2_{1-309mCherry} (450 nm, 1 Frosch, n=6), hChR2-T159C_{1-309mCherry} (450 nm, 7 Frösche, n=26), βBR (550 nm, 4 Frösche, n=17), BR (550 nm, 5 Frösche, n=18), Arch-3 (550 nm, 3 Frösche, n=17), Mac (550 nm, 4 Frösche, n=15), CsR (550 nm, 8 Frösche, n=34), ESR (400-600 nm, 4 Frösche, n=14), GR (400-600 nm, 9 Frösche, n=27).

Bei der Interpretation und Bewertung von Abbildung 17 muss beachtet werden, dass Einflüsse wie verschiedene Expressionslevel, Grad der funktionalen Faltung oder unterschiedliche Targeting-Effizienzen nicht berücksichtigt sind. Zudem zeigen die Kanalrhodopsine bei anderen elektrochemischen Bedingungen durchaus auch auswärts gerichtete Ströme über 500 nA. Trotzdem sind vor allem die hohen Ströme von CsR und GR im Vergleich zu den anderen Pumpen und Kanälen erstaunlich. Deswegen wurden im folgenden Abschnitt die Expression und das Targeting der mikrobiellen Rhodopsine näher untersucht.

2.1.3 Vergleich der Expression von ChR2 mit Ionenpumpen in Oozyten

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die absoluten Photostromamplituden der Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2 in Oozyten bei positiven Spannungen und physiologischen pH_o-Bedingungen lediglich im Bereich von 50-100 nA liegen, während z.B. die Protonenpumpe CsR Photoströme über 500 nA aufweist. Es ist nicht neu, dass die Kanalrhodopsine „*inward rectification*“ mit schwachen auswärts gerichteten Photoströmen aufweisen [69, 70], jedoch sind die beobachteten Unterschiede zwischen Pumpen und Kanälen trotzdem unerwartet groß. Die einfachste Erklärung für die Beobachtung ist, dass die Expression, die Faltung sowie das Targeting einiger Pumpen in Oozyten deutlich besser sind als das der untersuchten Kanalrhodopsine.

Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden Western-Blots angefertigt, um die Expression und das Membran-Targeting zu vergleichen. Hierfür wurden einige Ionenpumpen und cChR2-T159C mit je einem C-terminalen Myc-tag fusioniert und die daraus hergestellte RNA in Oozyten injiziert. Nach genau 4 Tagen wurde jeweils die gleiche Anzahl an Oozyten gepickt und die Membranfraktion isoliert (die Details der Durchführung sind im Methodenteil in Abschnitt 4.1.7 aufgeführt). Die Ergebnisse der Western-Blots sind in Abbildung 18 gezeigt.

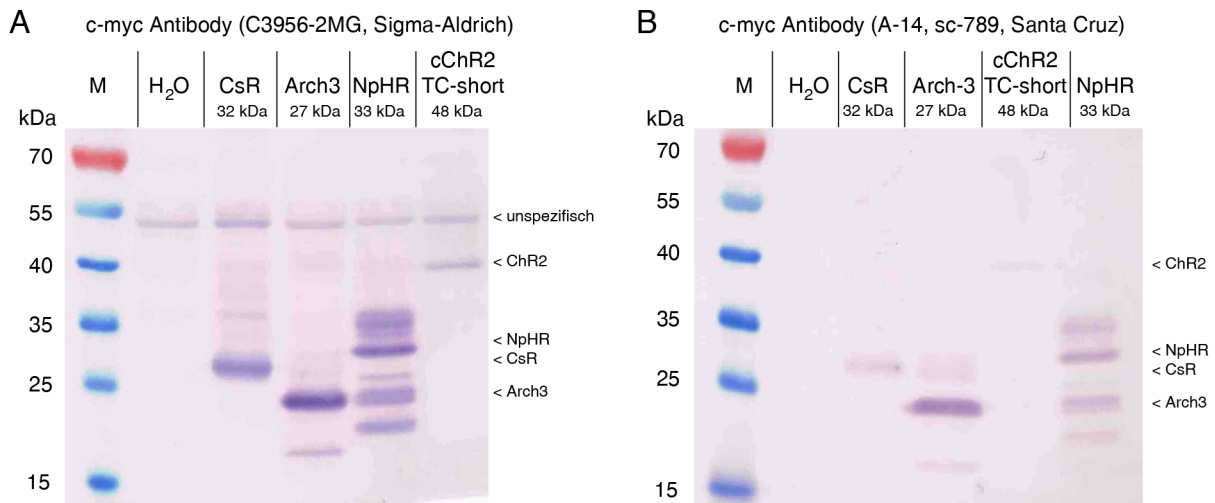


Abbildung 18: Repräsentative Western-Blots von Membranfraktionen aus Oozyten. Die Oozyten wurden zuvor mit RNA für die jeweiligen Rhodopsine oder mit Wasser als Negativ-Kontrolle injiziert. Weitere Details sind im Text aufgeführt.

Die Western Blots wurden zuerst mit dem Sigma-Antikörper durchgeführt (Abbildung 18A). Eine starke Bande konnte bei CsR und Arch-3 im erwarteten Größenbereich detektiert werden. ChR2-TC ergab lediglich eine schwache Bande im Vergleich zu CsR und Arch-3. NpHR zeigte ein komplexes Bandenmuster. Auffällig war die Bande bei 50 kDa, welche in allen Proben zu sehen war. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um unspezifische Kreuzreaktivität, weil diese Bande auch in der H₂O-Kontrolle auftauchte.

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse für NpHR und der Kreuzreaktivität in den H₂O-Kontrollen wurden die Proben mit einem weiteren Antikörper getestet (Abbildung 18B). Die unspezifische Kreuzreaktivität bei 50 kDa konnte dadurch erfolgreich eliminiert werden, während die Ergebnisse für die Rhodopsine qualitativ reproduziert wurden. Als quantitative Unterschiede sind zu nennen, dass zum einen die Bande von ChR2-TC mit dem Santa-Cruz-Antikörper deutlich schwächer ausgeprägt war. Zum anderen dominierte die Bande von Arch-3 deutlich gegenüber CsR. Das komplexe Bandenmuster mit NpHR wurde wieder beobachtet.

Die wesentliche Erkenntnis aus den Western-Blots ist folgende: Die Expression und das Targeting von ChR2-TC in die Zellmembran von Oozyten sind tatsächlich deutlich geringer als die von CsR und Arch-3. Dies könnte erklären, weswegen die absoluten Stromamplituden von ChR2-TC vergleichsweise gering im Vergleich zu den Pumpen in Abbildung 17 waren. Bei dem Vergleich der Amplituden und der Western-Blots muss bedacht werden, dass unterschiedliche Eigenschaften untersucht wurden und daher nur Indizien gewonnen werden konnten. Zum Beispiel sagen die Western-Blots nichts darüber aus, ob die detektierten Proteine auch tatsächlich funktional sind. Dies wäre eine von mehreren potentiellen Erklärungen für einige beobachtete Unterschiede.

Anhand von NpHR wird deutlich, dass mikrobielle Rhodopsine noch viele ungeklärte Charakteristika aufweisen und vermutlich in verschiedenen Expressionssystemen auch unterschiedlichen Proteinmodifikationen ausgesetzt sind.

2.1.4 Vergleich der Expression von ChR2 mit Ionenpumpen in HEK-Zellen

Als zusätzliche Informationsquelle und aufgrund der unklaren Unterschiede zwischen CsR und Arch-3 in den Western-Blots wurden Experimente in HEK-Zellen durchgeführt. HEK-Zellen bieten den Vorteil, dass das Targeting der Proteine mit Fluorophoren deutlich besser als über die Membranfraktionen aus Oozyten beurteilt werden kann. Die Ergebnisse hierzu sind in diesem Abschnitt zusammengefasst.

Abbildung 19A zeigt die absoluten stationären Stromamplituden von Protonenpumpen bei 0 mV in HEK-Zellen. Beim Vergleich der Stromamplituden der Protonenpumpen dominierten die Ströme von CsR-EGFP und GR-EGFP deutlich, während ESR-EGFP und Arch-3-EGFP geringere Ströme zeigten. Soweit stimmen die Beobachtungen aus HEK-Zellen und Oozyten überein. Dagegen zeigte die Protonenpumpe Mac in HEK-Zellen viel stärkere Ströme als in Oozyten.

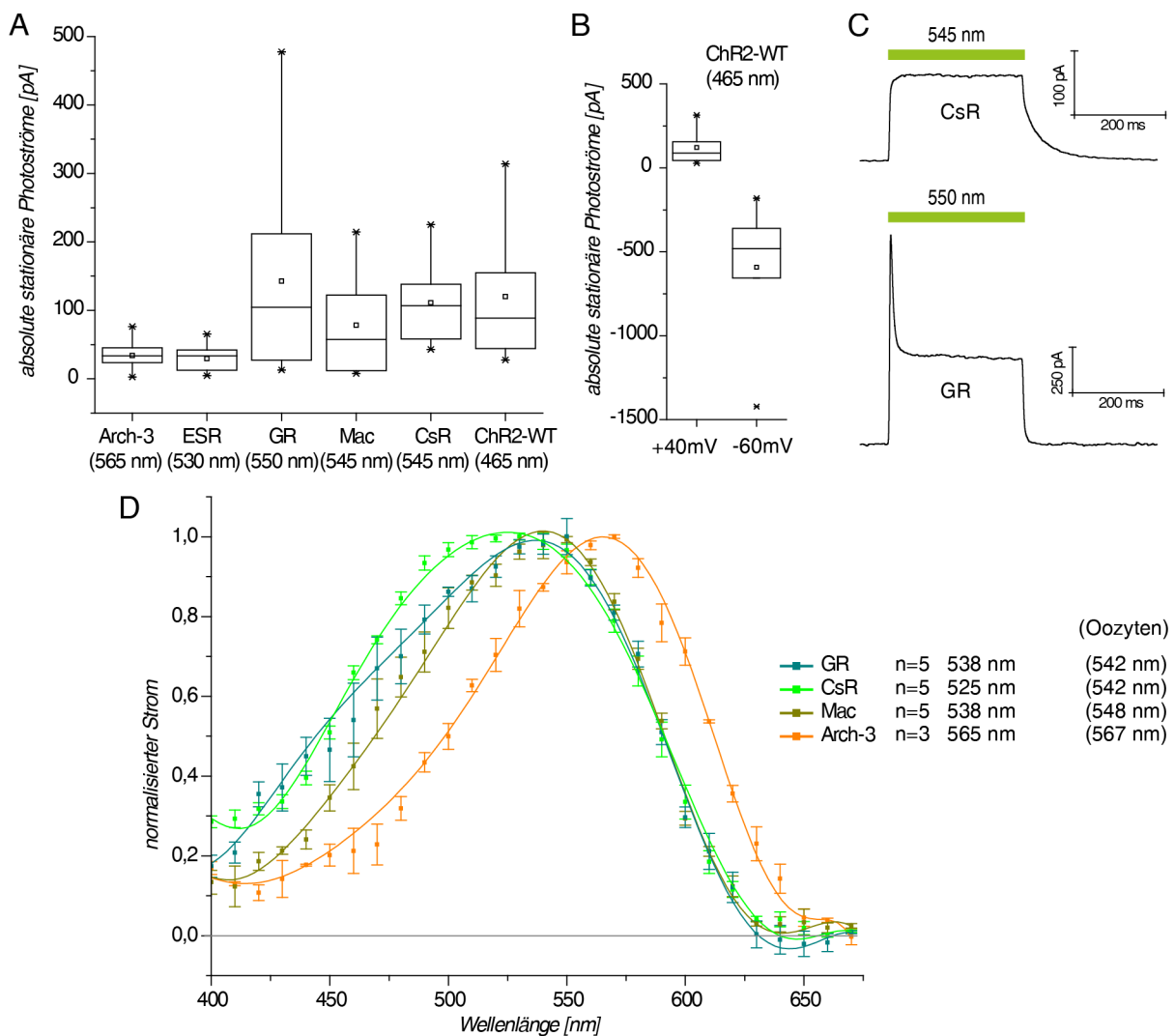


Abbildung 19: Vergleich der Stromamplituden von Rhodopsinen in HEK293-Zellen. Alle Messungen erfolgten in der „whole-cell“-Konfiguration mit 300 ms Belichtung und den Standard-HEK-Messpuffern mit $pH_{i/o}=7.2$ (siehe Tabelle 5). A: Absolute stationäre Photostromamplituden als Box-Chart-Diagramm. Die Belichtungswellenlängen sind in Klammern angegeben (100 % Intensität, ± 7 nm). Die Pumpen wurden bei 0 mV gemessen (transient transfiziert, Arch-3 n=14, ESR n=9, GR n=11, Mac n=10, CsR n=14). Für ChR2-WT sind die Amplituden bei +40 mV angegeben (n=11, stabile Zelllinie). B: Werte für ChR2-WT aus Abbildung A zusammen mit den negativen Amplituden bei -60 mV. C: Exemplarische Stromspuren von CsR und GR bei 0 mV. D: Aktionsspektren einiger Protonenpumpen in HEK-Zellen bei 0 mV. In Klammern sind die Maxima aus den Oozyten-Messungen gezeigt. Die Daten des Spektrums sind als mean \pm SE angegeben.

Zusätzlich sind in Abbildung 19A die absoluten stationären Ströme von ChR2-WT bei +40 mV gezeigt. Hier zeigt sich das gleiche Bild wie in Oozyten: die auswärts gerichteten Amplituden von ChR2 sind nicht größer als die Amplituden von GR, Mac oder CsR. Die Amplituden von ChR2 wären im Vergleich zu den Pumpen noch schwächer, wenn die Pumpen ebenfalls bei +40 mV gemessen worden wären. Abbildung 19B zeigt zusätzlich die negativen Amplituden von ChR2-WT bei -60 mV. Hierdurch wird gezeigt, dass die absoluten Stromamplituden von ChR2-WT bei negativen Haltespannungen deutlich größer als bei den Pumpen sind. Abbildung 19C zeigt anhand von Stromspuren von CsR-EGFP und GR-EGFP bei 0 mV, dass die Photoströme qualitativ identisch zu den Stromspuren in Oozyten sind. In Abbildung 19D sind die Aktionsspektren einiger Protonenpumpen gezeigt, welche sich teilweise von den Spektren aus Oozyten unterscheiden (Abbildung 10). Die Unterschiede lassen sich durch endogene Retinal-Derivate in Oozyten erklären, wie später für CsR entdeckt wurde (siehe Abbildung 31D und die dazugehörige Erklärung in Abschnitt 2.3.1).

Beim Vergleich der Amplituden von ChR2 mit den Daten aus den Western-Blots und den Oozyten (Abbildung 17 und Abbildung 18) muss beachtet werden, dass in HEK-Zellen nur ChR2-WT getestet wurde und nicht die T159C-Variante, welche höhere Amplituden als ChR2-WT zeigte [95]. Allerdings wurde für ChR2 in den Experimenten mit HEK-Zellen eine stabile ChR2-YFP Zelllinie verwendet [128]. Der Grund hierfür ist, dass die gezeigten Daten zu ChR2-WT für das Projekt mit Retinal-Analoga gemessen wurden (siehe Abschnitt 2.6). Eine stabile Zelllinie mit ChR2 sollte höhere Amplituden als transfizierte HEK-Zellen zeigen. Es wird angenommen, dass sich die Vorteile durch die stabile Zelllinie und die Nachteile durch das Fehlen der T159C-Mutation weitestgehend ausgleichen. Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die auswärts gerichteten Stromamplituden der Protonenpumpen und von ChR2-WT sowohl in Oozyten als auch in HEK-Zellen in einer vergleichbaren Größenordnung liegen.

Um die Unterschiede in den Stromamplituden in HEK-Zellen noch besser beurteilen zu können, wurden konfokale Aufnahmen der Zellen aufgenommen (siehe Abbildung 20). Die stabile ChR2-WT-Zelllinie zeigte eine sehr gute Expression und gutes Targeting in die Zellmembran. Die Protonenpumpe CsR zeigte eine vergleichbar gute Expression, jedoch waren auch einige intrazelluläre Agglomerate erkennbar. Alle anderen untersuchten Pumpen zeigten schlechtere Expressionen. Erstaunlich war das schlechte Targeting von Arch-3, weil Arch-3 in Neuronen bisher in Expression und Targeting die beste Protonenpumpe ist [48]. Hierdurch lassen sich die geringen Photoströme von Arch-3 in Abbildung 19A erklären. Die Protonenpumpen Mac, ESR und GR sind durch viele intrazelluläre Agglomerate gekennzeichnet und ähneln sich in ihrem Erscheinungsbild. Trotzdem konnten hier deutliche Unterschiede in den Stromamplituden festgestellt werden. GR fällt hierbei besonders auf, denn GR zeigte in HEK-Zellen ähnlich hohe Photostrom-Amplituden wie CSR, obwohl die Expression und das Targeting deutlich schlechter waren. Daher ist davon auszugehen, dass bei gleicher Expression und Targeting von GR und CsR die Protonenpumpe GR auch in Oozyten deutlich größere Photoströme als CsR zeigen würde. Es bleibt unklar, weswegen sich GR und ESR trotz der Ähnlichkeit in den Konfokalaufnahmen in den Amplituden unterscheiden.

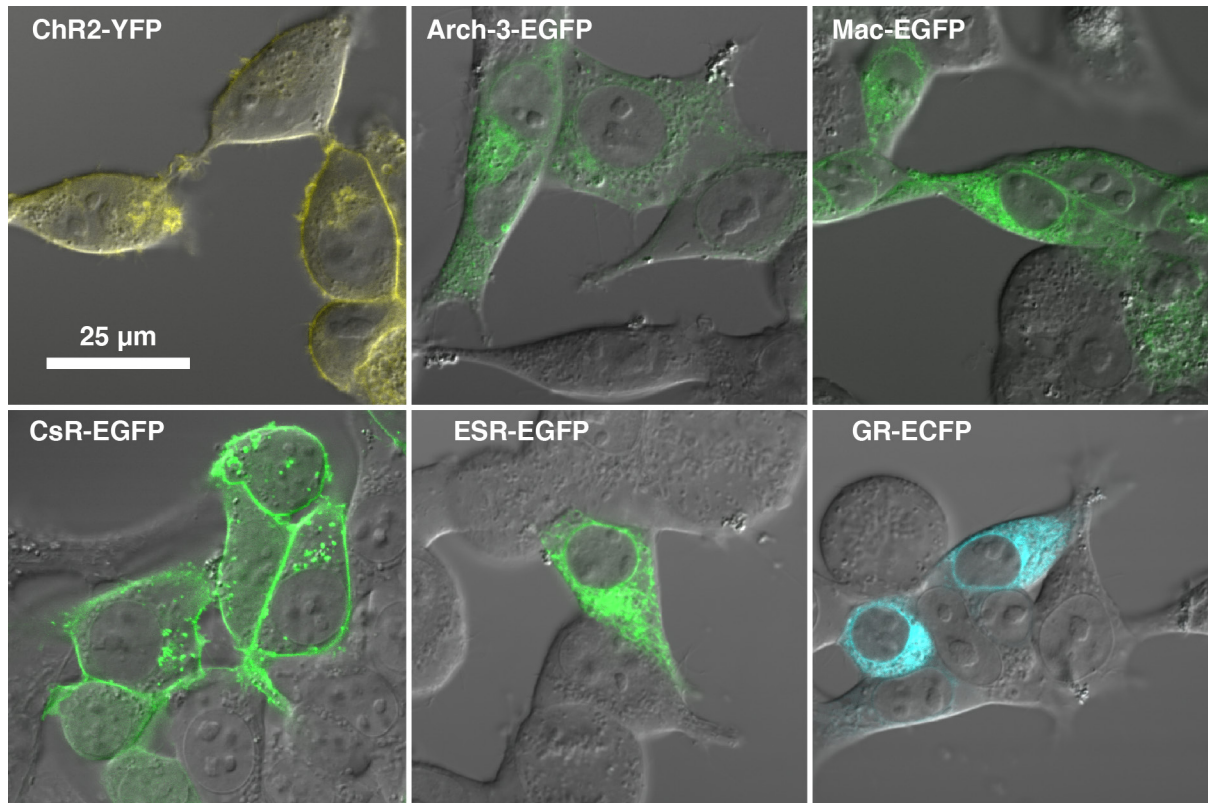


Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen verschiedener mikrobieller Rhodopsine in HEK293-Zellen. Die Bilder zeigen das unterschiedliche Targeting der Rhodopsine. Chr2-YFP wurde in einer stabilen Zelllinie exprimiert, während die Pumpen durch transiente Transfektion zur Expression gebracht wurden. Die Aufnahmen erfolgten mit Unterstützung von Dr. Thomas Korte von der AG Hermann (HU-Berlin) an einem Olympus FV-1000 (Laser Scanning-Mikroskop).

Die Daten über die Stromamplituden und die Expression in Oozyten und HEK-Zellen sind zur Übersicht in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Beurteilung erfolgt subjektiv und stellt daher nur die ungefähren Tendenzen dar.

Tabelle 1: Übersicht über die Expression und das Targeting verschiedener Rhodopsine.

	Oozyten		HEK-Zellen		
	Photoströme	Western-Blots	Photoströme	Expression	Targeting
Chr2-T159C	++	+	/	/	/
Chr2-WT (stabile Zelllinie)	/	/	+++	++++	++++
CsR	++++	+++	+++	++++	+++
Arch-3	+	++++	+	+	+
Mac	+	/	+++	++	++
GR	+++	/	+++	++	++
ESR	+	/	+	++	+

Letztendlich zeigen die untersuchten Rhodopsine eine hohe Variabilität in ihrer Expression, dem Targeting und in den Photoströmen. Die beobachteten Unterschiede in den Photoströmen lassen sich jedoch nicht allein durch Unterschiede in der Expression und dem Targeting erklären. Hierbei spielen funktionale Faltung, Quantenausbeute, Besonderheiten in den Photozyklen und die Wechselwirkung mit endogenen Retinal-Derivaten eine Rolle. In der Diskussion im Abschnitt 3.4 werden diese Aspekte näher betrachtet.

2.2 Untersuchung des *Gloeobacter*-Rhodopsins

Bei dem Vergleich der Protonenpumpen stellte sich heraus, dass die Protonenpumpen GR aus *Gloeobacter violaceus* und ESR aus *Exiguobacterium sibiricum* bei hohen elektrochemischen Gradienten einwärts gerichtete Ströme zeigten (Abschnitt 2.1.1). Die hohen Stromamplituden von GR ermöglichten das Phänomen der einwärts gerichteten Photoströme im Detail zu untersuchen. Eine nähere Untersuchung von ESR wurde nicht durchgeführt, weil ESR im Vergleich zu GR nur geringe Stromamplituden zeigte und ESR durch das Lys an Position des primären Protonendonors (BR-D96) eine Sonderstellung unter den Protonenpumpen einnimmt (siehe Abschnitt 1.3.2).

2.2.1 Detailliertere Untersuchung von GR-WT

Für GR-WT konnten in Oozyten bei niedrigen pH_o -Werten und negativen Haltespannungen einwärts gerichtete Photoströme beobachtet werden. In Abbildung 21 sind zur Übersicht die Stromspuren von GR-WT von einer repräsentativen Messung über den gesamten Spannungs- und pH_o -Bereich gezeigt.

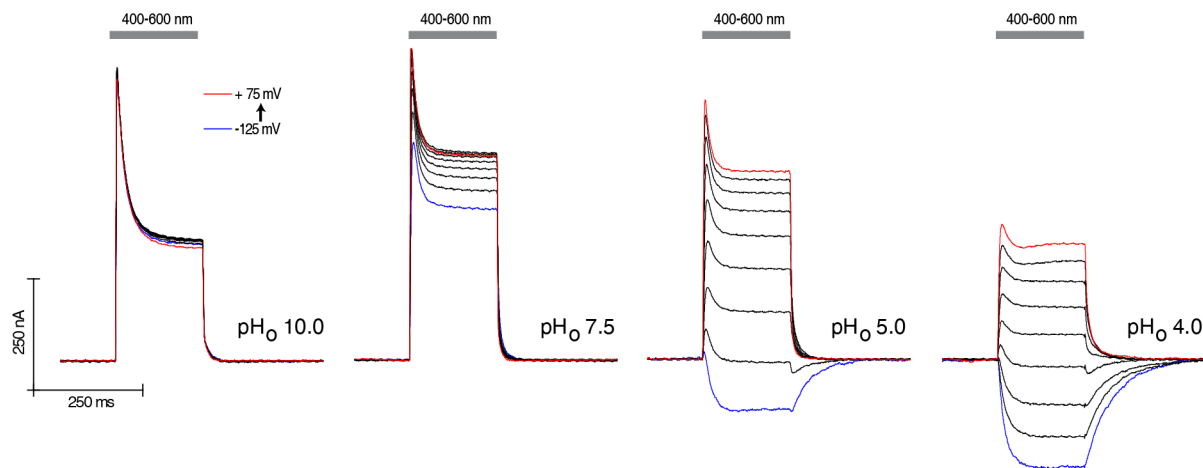


Abbildung 21: Stromspuren von GR-WT bei verschiedenen Haltespannungen und extrazellulären pH_o -Werten. Die gezeigten Stromspuren wurden alle an einer einzigen Oozyte gemessen.

Die genauere Untersuchung der Stromamplituden bei verschiedenen extrazellulären pH_o -Werten in Abbildung 22 zeigt, dass die Spannungsabhängigkeit nur bei niedrigen und physiologischen pH_o -Werten beobachtet werden kann. Bei $\text{pH}_\text{o}=9.0$ und $\text{pH}_\text{o}=10.0$ ist keine Spannungsabhängigkeit mehr erkennbar. Eine interessante Eigenschaft von GR-WT ist, dass die stationären Photostromamplituden bei positiven Haltepotentialen nur im pH_o -Bereich von 6 bis circa 7.5 am höchsten sind. Diese Eigenschaft lässt sich durch die Auftragung der Stromamplituden in Abhängigkeit vom pH_o -Wert am besten veranschaulichen, welche in Abbildung 22B gezeigt ist.

Die Untersuchung der Ionenselektivität von GR-WT ergab keine Abhängigkeit von verschiedenen extrazellulären Ionen außer von H^+ . Die Ionenselektivität von GR wurde von Jonas Wietek im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt und ist in der Supplement-Abbildung 1 in Vogt *et al.* gezeigt [129]. Hierbei wurden jedoch nicht die einwärts gerichteten Ströme untersucht, denn die Messungen erfolgten bei $\text{pH}_\text{o}=7.5$ und 0 mV. Theoretisch wäre auch ein passiver Einstrom von Na^+ -Ionen oder ein passiver auswärts gerichteter Strom von Cl^- -Ionen als Ursache für die negativen Ströme bei niedrigen extrazellulären pH_o -Werten denkbar. GR-WT zeigte jedoch keine Änderungen im Strom-Spannungs-Diagramm, wenn das Chlorid gegen Glukonat im extrazellulären Puffer ausgetauscht wurde.

(Abbildung 22C). Zudem sind weiterhin einwärts gerichtete Ströme messbar, wenn Na^+ gegen NMG ausgetauscht wird (Abbildung 22D). Ein passiver Transport von Na^+ oder Cl^- kann somit ausgeschlossen werden. Im Folgenden wird daher stets davon ausgegangen, dass die beobachteten Ströme von GR nur durch Protonentransport verursacht werden.

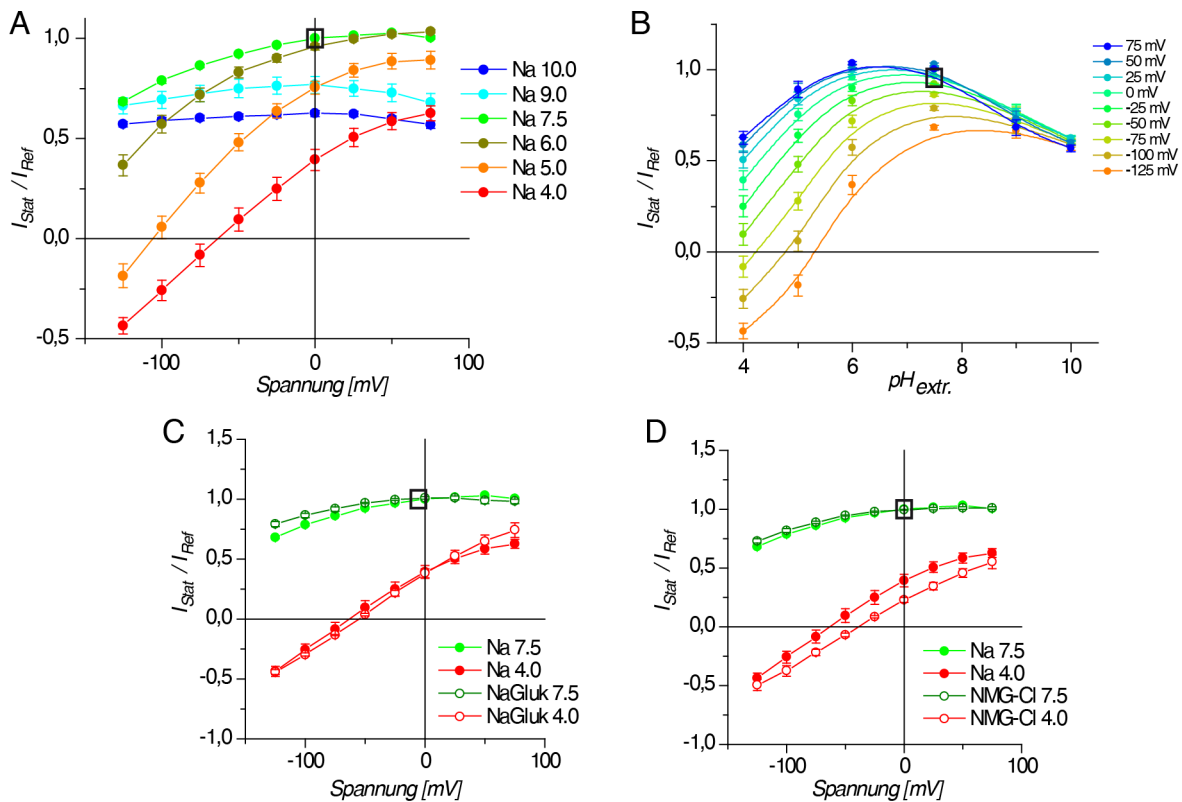


Abbildung 22: Detaillierte Untersuchung von GR-WT in Oozyten. Hierfür wurden die Oozyten für 200 ms mit dem Breitbandfilter von 400-600 nm belichtet und die stationären Ströme ausgewertet. A: Strom-Spannungskurven bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. $\text{pH}_o=[10/9/7.5/6/5/4]$ mit $n=[9/5/26/6/8/10]$. B: Auftragung der Stromspuren aus Abbildung A über die pH_o -Werte. C-D: Untersuchung der Strom-Spannungsabhängigkeiten nach Austausch des extrazellulären NaCl mit Na-Glukonat bzw. NaCl mit NMG-Cl (jeweils 100 mM). NaCl: wie in Abbildungen A und B, Na-Glukonat: $\text{pH}_o=[7.5/4]$ mit $n=[5/7]$, NMG-Cl: $\text{pH}_o=[7.5/4]$ mit $n=[5/3]$. Alle Daten sind als $\text{mean} \pm \text{SE}$ angegeben.

Im Falle des „Green-Proteorhodopsin“ wurde angenommen, dass der Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors (GPR-D97, \triangle BR-D85 bzw. GR-D121) eine wichtige Rolle für die einwärts gerichteten Ströme spielt, da dieser bei niedrigen pH_o -Werten protoniert vorliegen könnte [54, 55]. Würden die einwärts- und auswärts gerichteten Photoströme über je einen unterschiedlich protonierten Protonenakzeptor erfolgen, dann wäre in einem Aktionsspektrum ein deutlicher Unterschied in den Maxima der einwärts- und auswärts gerichteten Ströme zu erwarten [130, 131].

Daher wurden die Aktionsspektren der einwärts- und auswärts gerichteten stationären Photoströme von GR verglichen (Abbildung 23A). Es konnte im Aktionsmaximum kein Unterschied festgestellt werden. Detailliertere Aktionsspektren an GR-WT in HEK-Zellen bestätigten die Messungen aus Oozyten [129]. Daraus ist zu schließen, dass der Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors, zumindest in GR, wahrscheinlich keine zentrale Rolle für die einwärts gerichteten Photoströme spielt.

Im Weiteren wurden die einwärts gerichteten Ströme von GR auch auf einen potentiellen Zwei-Photonen-Prozess hin untersucht. Hierfür wurden Oozyten mit einem 550 nm-Laser für 10 ns belichtet. Die Messungen in den Abbildungen 23B und C zeigen, dass grundsätzlich einwärts

gerichtete Photoströme nach Laseranregung beobachtet werden können. Hierbei ist auffällig, dass die einwärts gerichteten Ströme erst verzögert nach einem auswärts gerichteten Strom auftreten (siehe z.B. die rot hervorgehobene Spur bei -75 mV in Abbildung 23C).

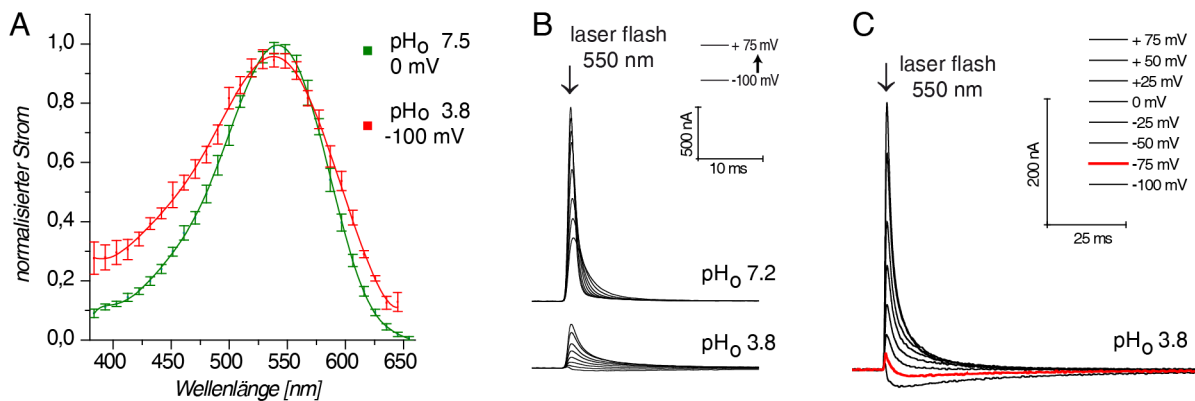


Abbildung 23: Aktionsspektren und Laser-Messungen an GR. A: Aktionsspektren der auswärts gerichteten stationären Ströme (pH₀=7.5, 0 mV, 300 ms Belichtung, n=5) und der einwärts gerichteten stationären Ströme (pH₀=3.8, -100 mV, 300 ms Belichtung, n=4). B: Eine Oozyte wurde mit einem Laser bei pH₀=7.2 und 3.8 belichtet (550 nm, 10 ns, 0.18 mW/mm², für weitere methodische Details siehe Abschnitt 4.2.5). Die Laser-Messungen wurden nur bei Spannungen von -100 bis +75 mV gemessen (bei stationärer Belichtung wurde auch bei -125 mV gemessen). C: Vergrößerte Darstellung der Messung aus Teilabbildung B bei pH₀=3.8. Nach einem auswärts gerichteten Strom sind einwärts gerichtete Ströme sichtbar. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

In späteren Experimenten stellte sich heraus, dass der Gegenion-Komplex mit dem primären Protonendonator durchaus eine entscheidende Rolle spielt, denn Mutationen im Gegenion-Komplex können zu passiven Photoströmen in Protonenpumpen führen (siehe Diskussion in Abschnitt 3.2.2).

2.2.2 Struktur- und Mutationsanalyse von GR

Es stellte sich nun die Frage, woher die Unterschiede in den Photoströmen der Pumpen vom Proteorhodopsin-Typ (PR-Typ, z.B. GR) und den Pumpen vom Bakteriorhodopsin-Typ (BR-Typ) stammen (siehe Abschnitt 2.1.1.3). Es war offensichtlich, dass unterschiedliche Bereiche oder direkt einzelne Aminosäure-Reste in der Sequenz für die Unterschiede verantwortlich sind. Protonenpumpen vom BR-Typ und PR-Typ weisen im Sequenz-Alignment sowohl konservierte als auch variable Bereiche auf. Abbildung 24A zeigt Ausschnitte aus einem Sequenz-Alignment von BR- und PR-Pumpen. Für die Mutationsanalyse von GR wurden Positionen ausgewählt, welche eine potentiell wichtige Rolle für die besonderen Eigenschaften der Pumpen vom PR-Typ spielen könnten. Die Details zu den jeweiligen Positionen werden später in diesem Abschnitt zusammen mit den Ergebnissen erläutert, wobei die Positionen GR-R118 und GR-Y88 erst in Abschnitt 2.4 besprochen werden.

Für GR ist bisher keine Kristallstruktur gelöst, jedoch kann aufgrund der Sequenzähnlichkeit die bekannte Struktur vom Xanthorhodopsin (XR, PR-Typ) verwendet werden [61], welche in Abbildung 24 gezeigt ist. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die entsprechenden Positionen von GR (bzw. BR) eingetragen. Alle gezeigten Positionen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von Mutanten näher untersucht. Allein die Position GR-D253 (\triangleq BR-D212) wurde nicht mutiert und ist nur zur Vollständigkeit mit dargestellt, weil dieses Aspartat als Teil vom Gegenion-Komplex in allen Protonenpumpen hoch konserviert vorliegt.

Ein wichtiger struktureller Unterschied zwischen den BR- und PR-Pumpen lässt sich erst anhand der Oberfläche der Kristallstrukturen erkennen. So zeigt die Kristallstruktur von XR in Abbildung 24E im Vergleich zu BR eine ausgedehnte extrazelluläre Einbuchtung („*extracellular cavity*“). Die Bedeutung des extrazellulären Halbkanales mit der Einbuchtung wurde erst im späteren Verlauf dieser Arbeit offensichtlicher und wird unter anderem in der Diskussion im Abschnitt 3.2.4 näher besprochen.

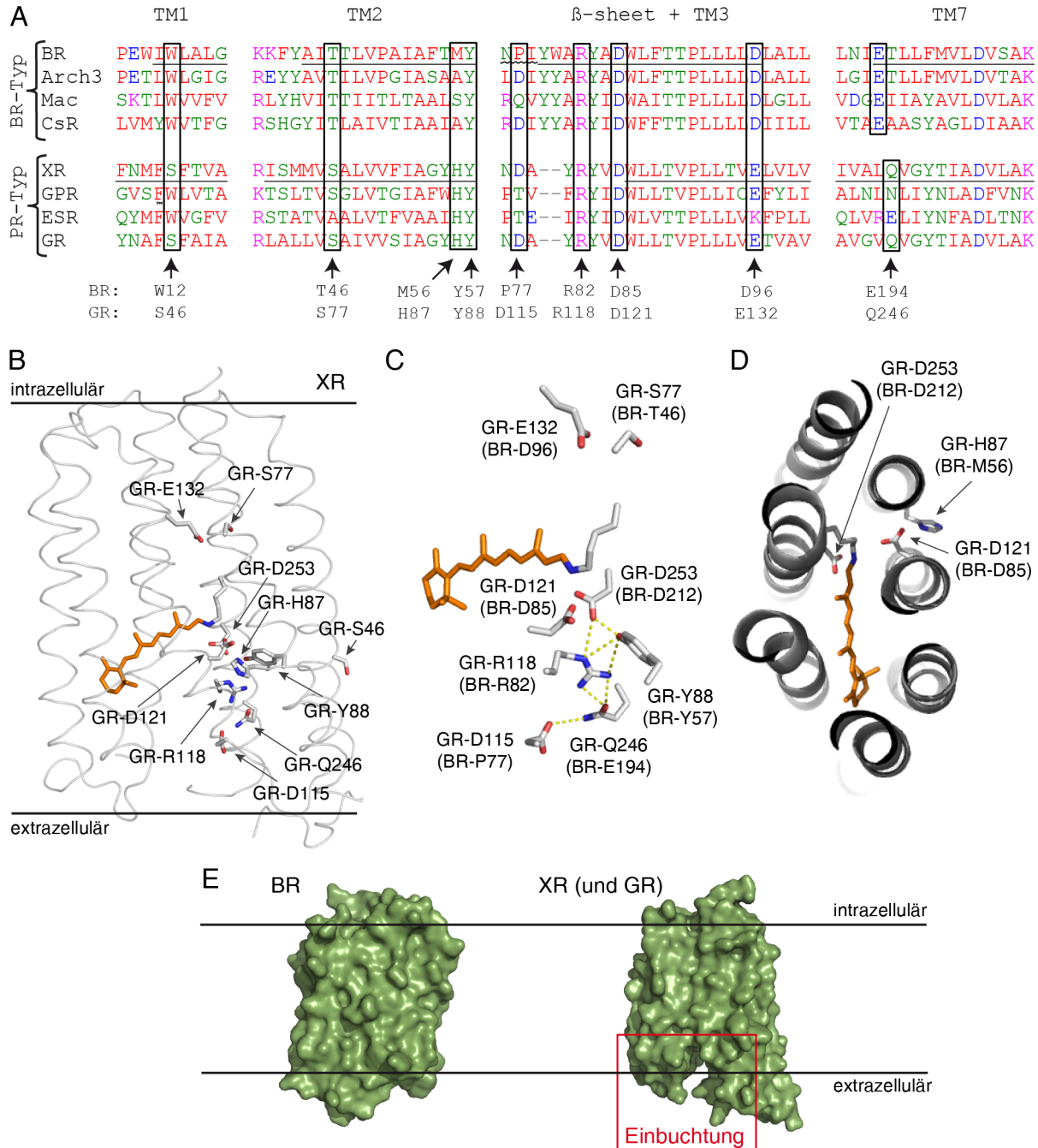


Abbildung 24: Sequenz- und Strukturanalyse von GR. A: Ausschnitte aus einem Alignment verschiedener Protonenpumpen. Das Alignment wurde mit dem web-basierten Tool „Clustal Omega“ erstellt (www.ebi.ac.uk). Bekannte Transmembran-Bereiche sind unterstrichen dargestellt (BR: 1MOL, XR: 3DDL). Positionen in GR, welche mutiert wurden, sind schwarz umrahmt. Weitere Details zu den Proteinen sind der Tabelle 2 im Material & Methodenteil zu entnehmen. Ein vollständiges Alignment von BR, CsR und GR ist in Abbildung 6 gezeigt. B-D: Gezeigt ist die Kristallstruktur von XR (3DDL), wobei nur die entsprechenden Positionen von GR (bzw. BR) eingetragen sind. E: Oberflächendarstellung der Kristallstrukturen von XR und BR. Bei der Pumpe XR ist eine extrazelluläre Einbuchtung erkennbar, welche wahrscheinlich auch bei GR existiert.

Das auffälligste Merkmal in der Sequenz der Pumpen vom PR-Typ ist ein Glutamat (GR-E132) statt eines Aspartats (BR-D96) als Protonendonor. Basierend auf dem Sequenz-Alignment in Abbildung 24 ist anzunehmen, dass in beiden Typen an Pumpen der primäre Protonendonor über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Thr oder Ser verknüpft ist (GR-S77 bzw. BR-T46). Für XR ist bekannt, dass zwischen XR-E107 und XR-S52 (\triangle BR-D96 und BR-T46) ein Wassermolekül mit eingebunden ist [61]. Die Mutanten GR-E132D, GR-S77A und GR-S77C wurden untersucht, um die Relevanz dieser Positionen für die Pumpaktivität in GR zu untersuchen. In allen drei Mutanten konnte der gleiche Effekt beobachtet werden: die einwärts gerichteten Photoströme waren massiv in ihrer Quantität reduziert (Abbildung 25). Hierbei ist zu beachten, dass aus qualitativer Betrachtungsweise weiterhin negative Ströme zu beobachten waren. Die Pumpaktivität dieser Mutanten ist lediglich leicht reduziert, wie die Umkehrpotentiale in Abbildung 28 zeigen.

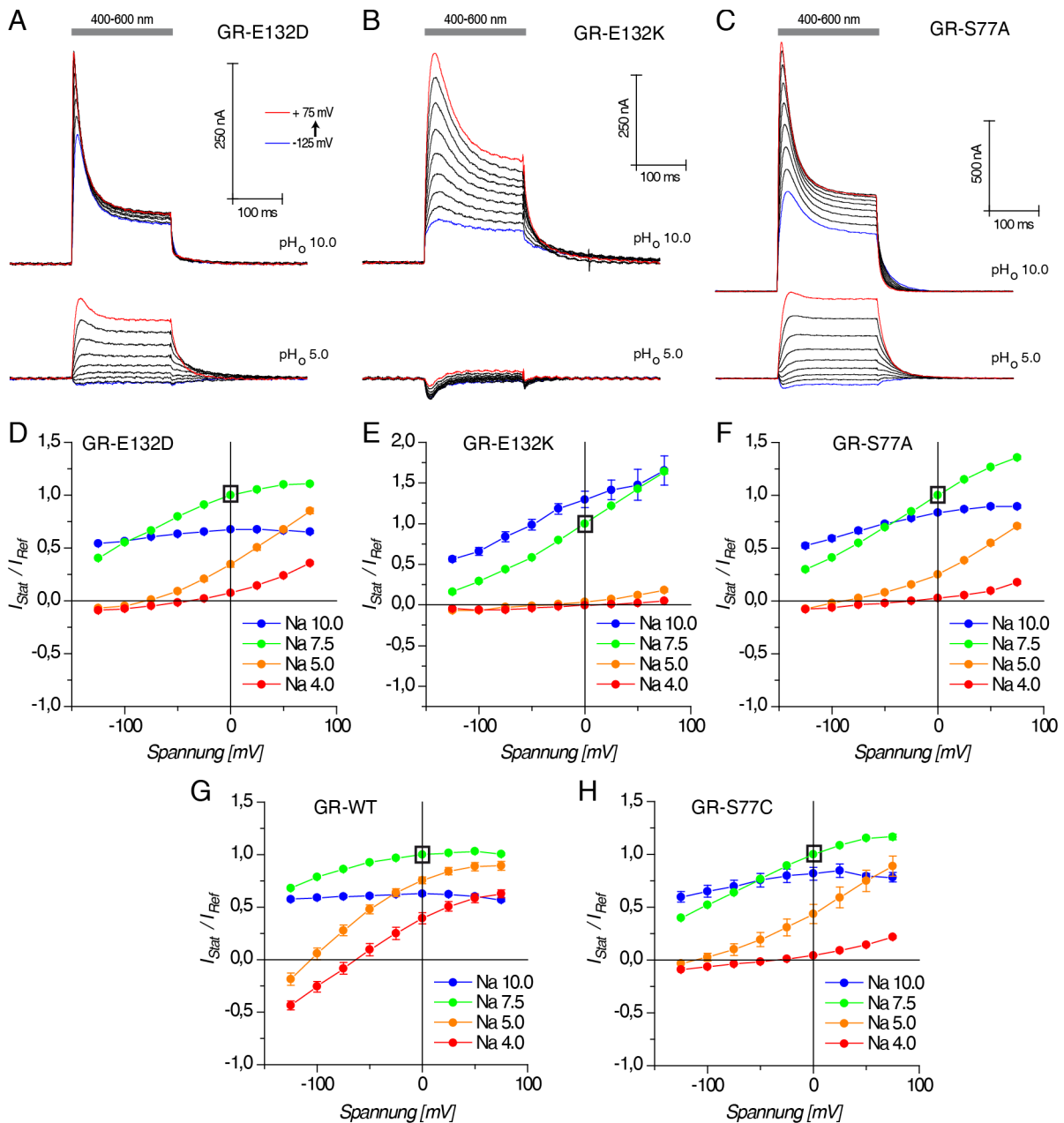


Abbildung 25: Mutationsanalyse des primären Protonendonors in GR. Die Oozyten wurden jeweils mit 400-600 nm für 200 ms bei verschiedenen Spannungen belichtet. A-C: Stromspuren der Mutanten bei $\text{pH}_0=7.5$ und 5.0. D-H: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme. Die Referenz-Bedingungen für die Normalisierungen sind jeweils mit dem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $\text{pH}_0=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{\text{E132D}}=[4/10/4/3]$, $n_{\text{E132K}}=[5/8/5/4]$, $n_{\text{S77A}}=[4/10/4/5]$, $n_{\text{WT}}=[9/26/8/6-10]$, $n_{\text{S77C}}=[5/9/9/9]$. Alle Daten sind als mean \pm SE angegeben.

Eine weitere untersuchte Mutante an der Position des Protonendonors war GR-E132K. Die Motivation hierfür war die Frage, ob eine Protonenpumpe durch Austausch der negativen Aminosäure gegen eine positive Aminosäure weiterhin funktional bleibt. Der Hintergrund hierfür ist die Tatsache, dass die Protonenpumpe ESR ein Lysin an dieser Position besitzt und trotzdem funktional ist, wie in dieser Arbeit erstmals mit elektrophysiologischen Messungen gezeigt wurde (siehe Abbildung 11). Abgesehen von diesem Lysin ist ESR eine typische Pumpe vom PR-Typ. Interessanterweise ist GR-E132K weiterhin funktional, aber jedoch ohne einwärts gerichtete stationäre Ströme (Abbildung 25B). Sowohl die *on*- als auch *off*-Kinetik von GR-E132K sind im Vergleich zum WT verlangsamt (Vergleich von Abbildung 21 mit Abbildung 25B). Die einwärts gerichteten transienten Ströme bei $pH_o=5.0$ zusammen mit den auswärts gerichteten stationären Strömen deuten auf einen komplexen Photozyklus für GR-E132K hin, welcher jedoch in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Bisher konnte festgestellt werden, dass der intrazelluläre Komplex aus GR-E132 zusammen mit S77 eine wichtige Rolle in den Photostromamplituden der einwärts gerichteten Ströme spielt, welche durch Mutationen massiv reduziert werden konnten.

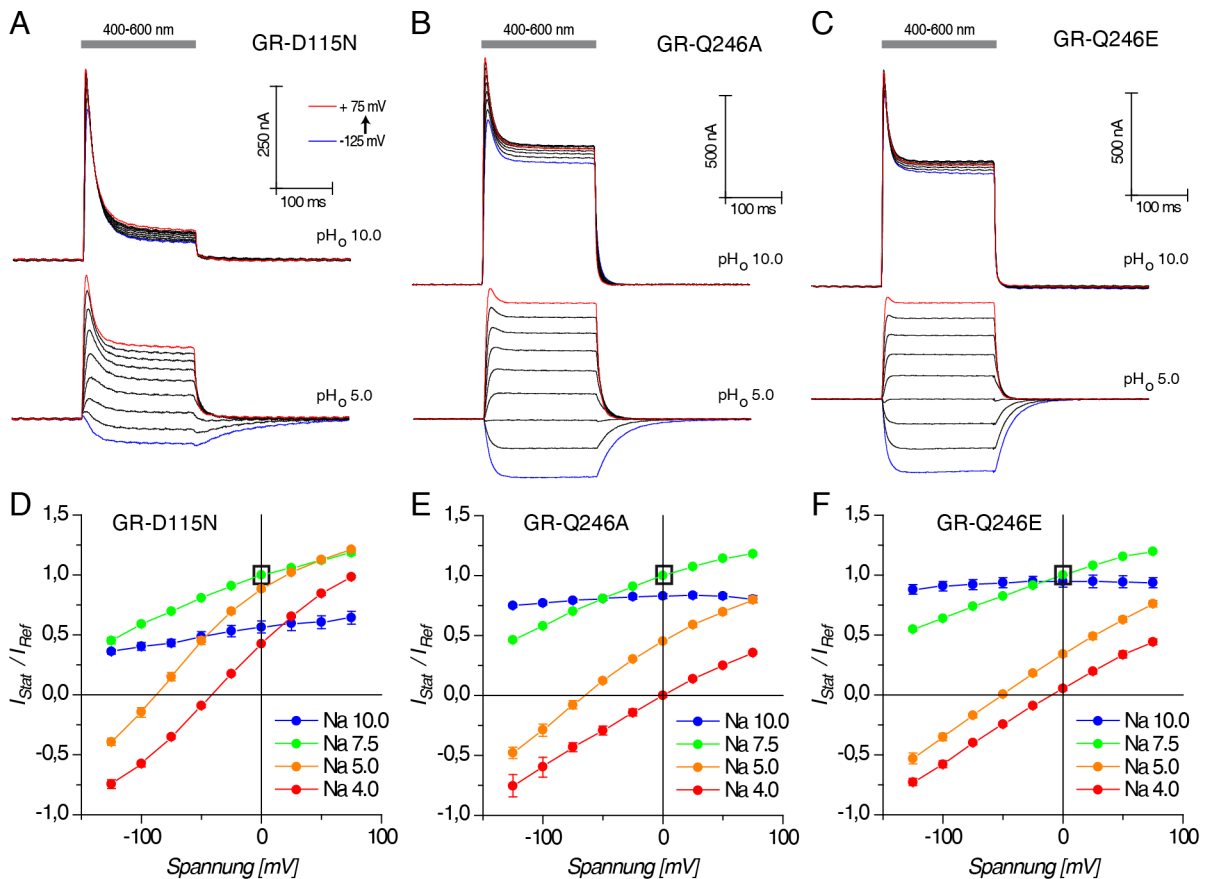


Abbildung 26: Mutationsanalyse der extrazellulären Seite von GR. Die Oozyten wurden jeweils mit 400-600 nm für 200 ms bei verschiedenen Spannungen belichtet. A-C: Stromspuren der Mutanten bei $pH_o=7.5$ und 5.0. D-F: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme. Die Referenz-Bedingungen für die Normalisierungen sind jeweils mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. Die Strom-Spannungskurve von GR-D115N entspricht im Wesentlichen der vom GR-WT. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{D115N}=[5/8/4/4]$, $n_{Q246A}=[4/8/5/5]$, $n_{Q246E}=[4/8/4/5]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Im Weiteren wurde der extrazelluläre Teil von GR näher untersucht. Anhand des Strukturvergleiches (aber nicht anhand des Alignments) von GR mit den anderen Pumpen wurde vermutet, dass das Aspartat von GR-D115 die Rolle des Glutamats von BR-E194 einnehmen könnte. Die Position BR-E194 ist in BR Teil des „proton-release-Komplexes“ (siehe Abschnitt 1.2). Die Mutante GR-D115N ähnelt jedoch sehr den Stromspuren und der Spannungsabhängigkeit von GR-WT, weswegen dieser Position

wahrscheinlich keine große Bedeutung beigemessen werden kann (Abbildungen 26A und D). Direkt an der Position von BR-E194 liegt das Glutamin GR-Q246, welches wahrscheinlich Bestandteil der extrazellulären „Einbuchtung“ ist (Abbildung 24). Daher wurde diese Position mit den Mutanten GR-Q246A und Q246E genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 gezeigt. In beiden Mutanten GR-Q246A und Q246E konnten die gleichen Effekte beobachtet werden: beide sind funktional und die einwärts gerichteten Ströme sind deutlich ausgeprägter als in GR-WT. Zusätzlich reduzierten sich die stationären Ströme von GR-Q246A/E beim Wechsel von $pH_o=7.5$ zu 10.0 geringer als beim GR-WT.

An dieser Stelle seien auch die Mutanten GR-S46D, H87N/A und D121T genannt, deren experimentellen Ergebnisse in Abbildung 27 gezeigt sind. Die Position GR-S46 ist im Unterschied zu allen anderen untersuchten Positionen zu der Außenseite vom Protein gerichtet und ragt direkt in die Lipid-Doppelschicht (siehe Abbildung 67 in der Diskussion). Diese Position ist nur in GR und XR konserviert, jedoch nicht in anderen Pumpen, sowohl vom BR-Typ als auch vom PR-Typ. Die Mutante GR-S46D ist durch eine starke pH_o - und Spannungsabhängigkeit gekennzeichnet. Interessanterweise zeigte die Mutante GR-S46D von allen untersuchten GR-Mutanten den größten Verlust an protonenmotorischer Kraft und zeigte bereits bei $pH_o=7.5$ einwärts gerichtete Photoströme (bei negativen Spannungen). Die Position GR-S46 wird aufgrund der stark ausgeprägten Effekte in der Diskussion im Abschnitt 3.2.4 zusammen mit den Struktur-Abbildungen anderer Rhodopsine näher besprochen.

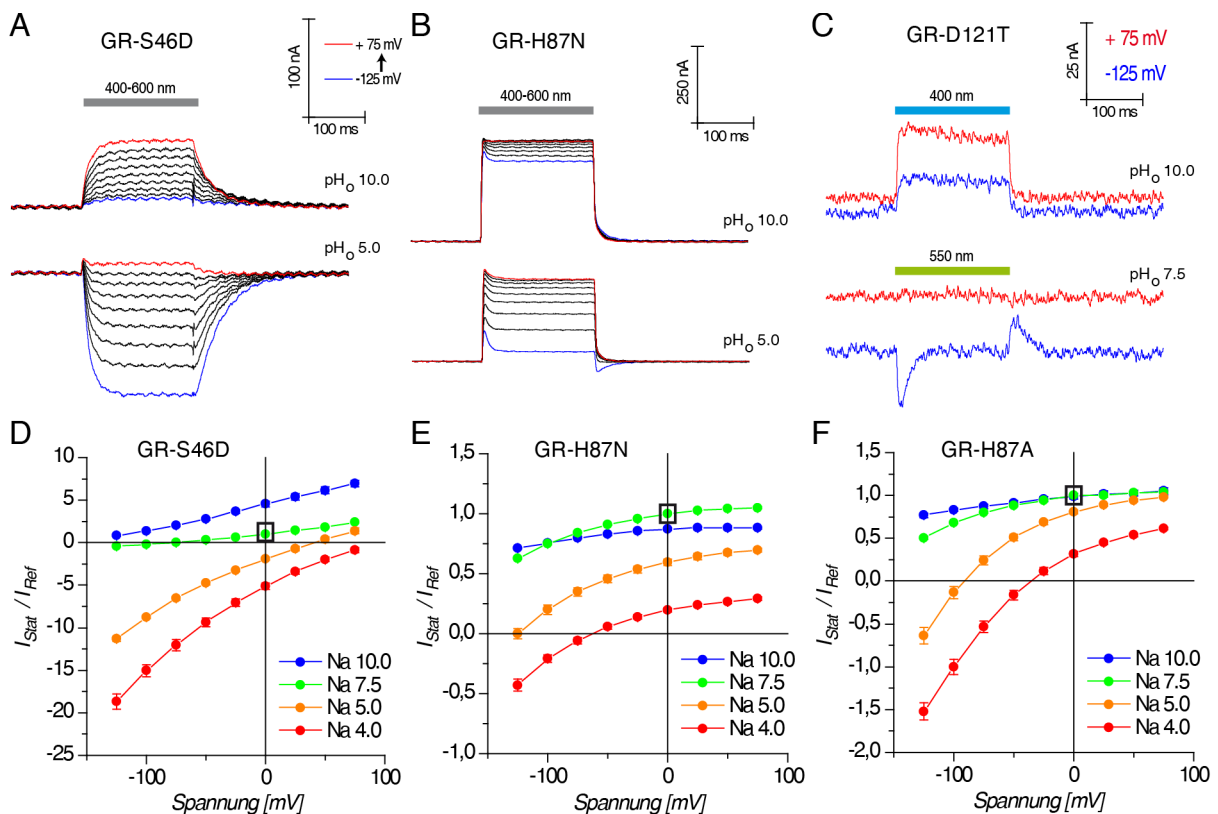


Abbildung 27: Untersuchung weiterer Positionen in GR. Die Oozyten wurden jeweils mit 400-600 nm für 200 ms bei verschiedenen Spannungen belichtet. A-C: Stromspuren der Mutanten bei pH_o -Werten. D-F: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme. Die Referenz-Bedingungen für die Normalisierungen sind jeweils mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{S46D}=[4/4/3/3]$, $n_{H87N}=[4/7/4/4]$, $n_{H87A}=[4/5/4/4]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Im Weiteren wurde die Position GR-H87 (\triangleq BR-M56) zu Asparagin und Alanin mutiert. Der Grund hierfür war, dass das Histidin an dieser Position in Pumpen vom PR-Typ hoch konserviert ist und als Modulator und Interaktionspartner des primären Protonendonors (\triangleq BR-D85 bzw. GR-D121) diskutiert wurde [132, 133]. Die Mutanten GR-H87N und GR-H87A zeigen Effekte auf die Strom-Spannungsabhängigkeiten, jedoch spielt GR-H87 im Vergleich zu anderen mutierten Positionen im Protein offenbar keine entscheidende Rolle für die einwärts gerichteten Ströme von GR.

Zuletzt wurde der primäre Protonendonator GR-D121 (\triangleq BR-D85) direkt mutiert. Die Mutante GR-D121T zeigte ein sehr komplexes Verhalten und unterstreicht die zentrale Bedeutung dieser Position für GR selber und für Protonenpumpen im Allgemeinen. Unter basischen Bedingungen und Blaulicht waren auswärts gerichtete stationäre Ströme zu beobachten, während mit grünem Licht bei physiologischen und niedrigen pH_o -Werten einwärts und auswärts gerichtete transiente Ströme zu beobachten waren (Abbildung 27C). Die Stromamplituden waren generell stark reduziert gegenüber GR-WT und den anderen Mutanten. GR-D121T zeigt grundlegend die gleichen Eigenschaften wie die äquivalente Mutation in der Protonenpumpe CsR und wird daher hier nicht detaillierter beschrieben (\triangleq CsR-D86T, siehe hierfür Abschnitt 2.3.3).

2.2.3 Umkehrpotentiale der GR-Mutanten

Bisher wurden von den GR-Mutanten nur die Stromspuren und die Strom-Spannungskurven gezeigt. In Abbildung 28 sind die Umkehrpotentiale der wichtigsten Mutanten dargestellt. Die Ergebnisse aus der Betrachtung der Umkehrpotentiale lassen sich in zwei Punkten zusammenfassen:

- 1) Die Umkehrpotentiale der Mutanten verlaufen parallel zu den Werten vom GR-WT und zu den theoretischen Umkehrpotentialen für passiven Protonentransport. Die PMF ist wie beim Wildtyp unabhängig vom pH_o -Wert.
- 2) Keine einzige Mutante führte zu einer Erhöhung der elektromotorischen Kraft der Pumpe. Es wurde bei den Mutanten eine Erniedrigung oder keine Änderung der elektromotorischen Kraft beobachtet.

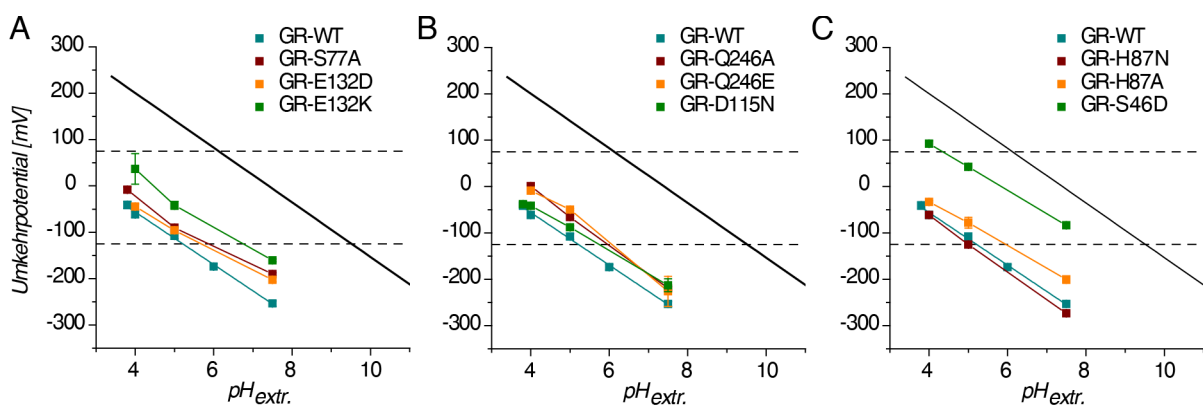


Abbildung 28: Umkehrpotentiale von ausgewählten GR-Mutanten. Als Grundlage dienen die Strom-Spannungs-Plots aus den Abbildungen 25 bis 27. Die Ergebnisse sind zur Übersichtlichkeit auf drei Einzelabbildungen aufgeteilt. Soweit vorhanden wurden Messwerte bei $pH_o=3.8$ mit hinzugenommen ($n_{wt}=3$, $n_{D115N}=3$, $n_{S77A}=4$). Die gestrichelten Linien grenzen den Messbereich ein, in welchem die Umkehrpotentiale direkt bestimmt wurden. Außerhalb des Bereiches wurden die Werte extrapoliert. Die durchgehende schwarze Linie kennzeichnet die theoretischen Umkehrpotentiale eines passiven Protonentransportes in Oozyten. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

2.2.4 Doppelpulsexperimente von GR-WT, GR-E132D, ESR-WT und CsR-WT

Bei der Untersuchung verschiedener Protonenpumpen (Abbildung 11A) war aufgefallen, dass Pumpen vom PR-Typ sich offenbar kinetisch von anderen Protonenpumpen unterscheiden. Deswegen wurde mit Hilfe von Doppelpulsexperimenten die Gesamtdauer des Photozyklus von GR-WT mit GR-E132D (\triangle BR-D96) verglichen. Bei einem Doppelpulsexperiment wird die Oozyte zweimal hintereinander belichtet (siehe Schema in Abbildung 29A). Hierbei wird das Zeitintervall zwischen den Belichtungen schrittweise gesteigert bis die Photoströme aus beiden Belichtungen übereinstimmen. Somit lässt sich bestimmen, wie lange es dauert, bis alle am untersuchten Photostrom beteiligten Intermediate den Photozyklus durchlaufen haben und sich das Protein wieder im Grundzustand befindet.

Interessanterweise ist die Gesamtdauer des Photozyklus von GR-WT selbst bereits vom pH_o -Wert abhängig, wie in Abbildung 29B zu sehen ist. Bei $pH_o=7.5$ sind nach 150 ms ($T_{50\%} \approx 25$ ms) alle GR-Rhodopsine wieder in den Grundzustand zurückgekehrt, während dies bei $pH_o=10.0$ mit mindestens 400 ms ($T_{50\%} \approx 83$ ms) deutlich länger dauert. Intensivere Untersuchungen an GR-WT mit Doppelpulsexperimenten bei verschiedenen Haltespannungen (-75 mV, 0 mV und +50 mV) haben gezeigt, dass die Kinetik des gesamten Photozyklus nur minimal von der Spannung abhängt (Masterarbeit von Jonas Wietek). Wenn GR-WT und GR-E132D direkt und unter identischen Bedingungen bei $pH_o=7.5$ und 0 mV verglichen werden, dann zeigt sich, dass GR-E132D mit 300 ms ($T_{50\%} \approx 31$ ms) im Vergleich zu GR-WT circa doppelt so lang für den gesamten Photozyklus braucht (Abbildung 29C).

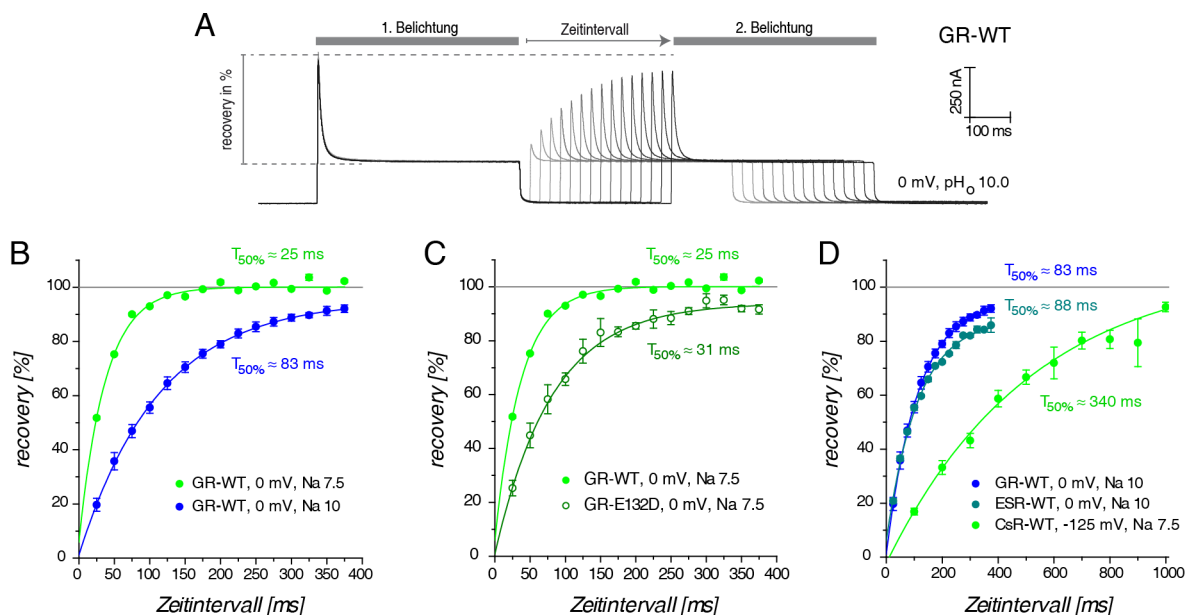


Abbildung 29: Doppelpulsexperimente von GR-WT, GR-E132D, ESR-WT und CsR-WT. A: Messschema am Beispiel von GR-WT. Für die Auswertung wurde die „recovery“ des Peak-Stroms in Abhängigkeit vom Zeitintervall bestimmt. Die Messpunkte wurden monoexponentiell gefittet. B: Vergleich von GR-WT bei $pH_o=7.5$ ($n=4$) und $pH_o=10.0$ ($n=3$). Die Belichtung erfolgte jeweils für 500 ms mit 400-600 nm. Nach jeder Doppelbelichtung wurden 60 s bis zur nächsten Messung gewartet. C: Vergleich von GR-WT (identisch zu Teilabbildung B) mit GR-E132D ($n=4$). D: Vergleich von GR, ESR und CsR. Die Daten von GR entsprechen den Werten aus Teilabbildung B. ESR wurde mit 550 nm gemessen ($n=3$). CsR wurde ebenfalls mit 550 nm gemessen ($n=3$), wobei zwischen jeder Doppelbelichtung bei CsR nur 15 s gewartet wurde. Da der Photozyklus von CsR nur 1 s benötigt, wurde dies als nicht kritisch erachtet. Alle Daten sind als $\text{mean} \pm \text{SE}$ angegeben.

Abbildung 29D zeigt den Vergleich von GR und ESR (beide PR-Typ) mit der Protonenpumpe CsR (BR-Typ). Es ist erkennbar, dass CsR einen langsameren Photozyklus als ESR und GR zeigt. Ein direkter Vergleich von GR und ESR mit CsR bei gleichen pH_o -Wert und Spannung war nicht möglich, da die Ströme von ESR bei niedrigen pH-Werten zu schwach ausgeprägt sind und CsR nur bei sehr negativen Spannungen überhaupt transiente Peak-Ströme in Oozyten aufweist. Messungen mit längeren Zeitintervallen zwischen der 1. und 2. Belichtung von ESR und GR wurden bei $\text{pH}_o=10$ nicht durchgeführt, weswegen unklar ist, wann die 100 % in Abbildung 29B exakt erreicht werden (jedoch spätestens nach 60 Sekunden).

Trotzdem zeigt sich die Tendenz, dass Protonenpumpen vom PR-Typ offenbar grundsätzlich schneller den Photozyklus durchlaufen als Pumpen vom BR-Typ und daher pro Zeiteinheit mehr Protonen pumpen können. Die Bedeutung der hier gezeigten Experimente zum Verständnis der Diversität der Protonenpumpen wird in der Diskussion im Abschnitt 3.4 näher diskutiert.

2.3 Untersuchung des *Coccomyxa*-Rhodopsins

Bisher wurde festgestellt, dass sich einige Protonenpumpen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften markant von Bakteriorhodopsin unterscheiden. Hierbei waren vor allem die Pumpen vom PR-Typ auffällig, welche bei hohen elektrochemischen Gradienten passive, einwärts gerichtete Photoströme zeigen. Die Mutationsanalyse von GR hat gezeigt, dass die einwärts gerichteten Ströme durch Mutationen in ihrer Quantität deutlich reduziert werden können, jedoch bleiben Fragen offen. Zum Beispiel bewirkte die in dieser Arbeit untersuchte Mutante GR-E132D im „Green-Proteorhodopsin“ (Δ GPR-E108D) genau den entgegen gesetzten Effekt und verstärkte die einwärts gerichteten Photoströme [55]. Zudem zeigte sich bei der Durchsicht der äußerst umfangreichen Literatur zu Bakteriorhodopsin, dass zwar viele Positionen in Protonenpumpen bereits spektroskopisch untersucht wurden, aber nur in den seltensten Fällen mit elektrophysiologischen Methoden. Übergeordnet stellte sich auch weiterhin die Frage, wodurch die Pumpen und Kanalrhodopsine unterschiedliche Funktionalitäten aufweisen, obwohl beide über viele gemeinsam konservierte Sequenz-Bereiche verfügen.

Letztendlich wurde es als sinnvoll erachtet, eine Protonenpumpe vom BR-Typ systematisch und elektrophysiologisch in nativen Zellen mit Hilfe von Mutanten zu untersuchen. Hierbei bot sich die Protonenpumpe CsR aufgrund der vergleichsweise hohen Photostromamplituden in Oozyten an. Abbildung 30 zeigt eine Übersicht über die mutierten Positionen in CsR. Im Folgenden wird CsR-WT kurz näher vorgestellt. Anschließend erfolgt die Zusammenfassung der elektrophysiologischen Mutationsanalyse von potentiell wichtigen Bereichen im Protein.

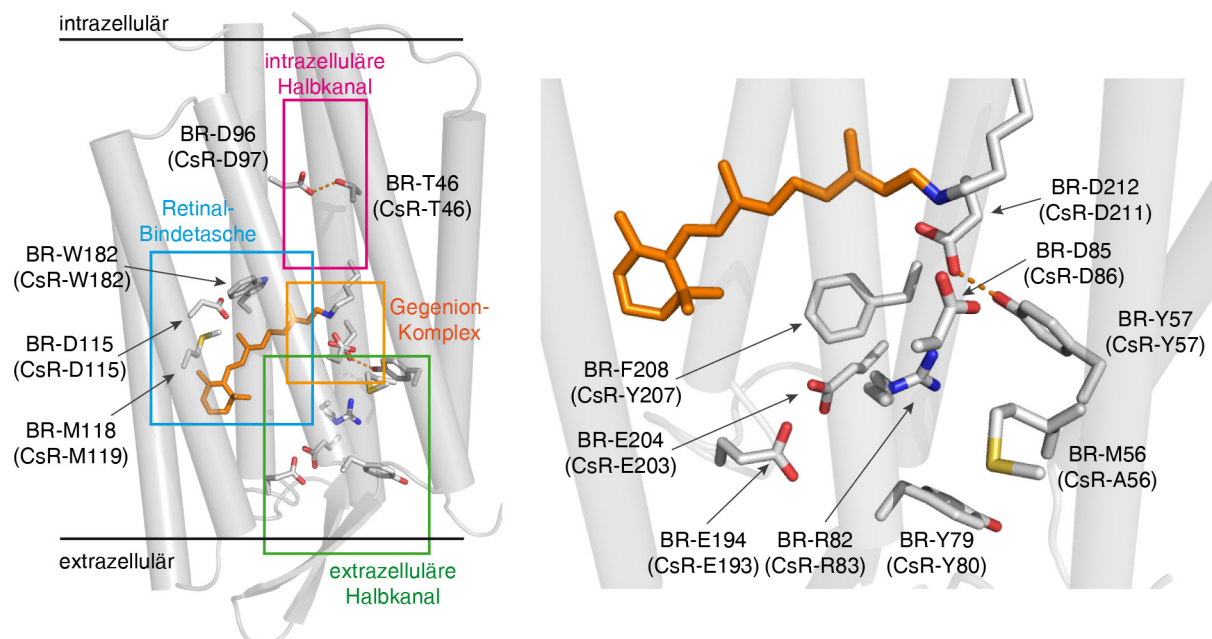


Abbildung 30: Übersicht über mutierte Positionen in CsR. Gezeigt ist die Kristallstruktur von BR (1C3W). Die Einteilung der Positionen zu größeren Strukturelementen ist besonders beim Gegenion-Komplex und dem extrazellulären Halbkanal nicht eindeutig. Alternative Darstellungen der Proteinbereiche zusammen mit intramolekularen Wasserpositionen sind in Abschnitt 3.2 gezeigt.

2.3.1 CsR als Stellvertreter der Protonenpumpen vom BR-Typ

Der Vergleich von CsR mit BR zeigte bereits, dass beide Pumpen unter allen gemessenen Bedingungen keine einwärts gerichteten Photoströme aufweisen (Abbildungen 11 und 12). Als ein Unterschied zwischen beiden wurde festgestellt, dass die Spannungsabhängigkeit von CsR größer als von BR war, während BR eine höhere pH_o -Abhängigkeit zeigte (Abbildung 13). Davon abgesehen sind die Gemeinsamkeiten sehr hoch und die Sequenz-Identität von CsR zu BR beträgt circa 34 %, während die von CsR zu GR nur bei 26 % liegt (Identität=exakte Übereinstimmung in Position und Aminosäure, EMBOSS Waterman alignment tool, EMBL-EBI). Des Weiteren zeigt CsR auch im kinetischen Profil Übereinstimmungen zu BR, wie im Folgenden gezeigt wird.

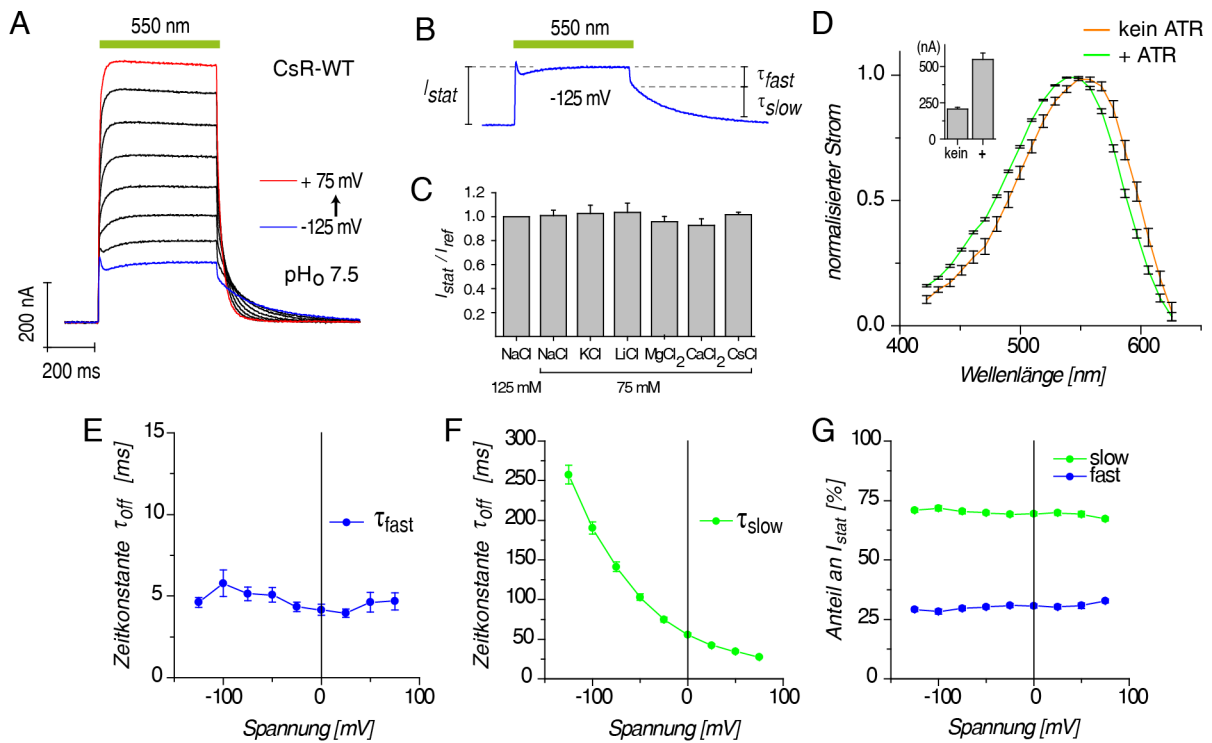


Abbildung 31: Charakterisierung von CsR-WT in Oozyten. A: Typische Stromspuren bei verschiedenen Spannungen. B: Vergrößerte Darstellung der Photoströme bei -125 mV mit transienten Peak-Strom und biexponentieller Kinetik. C: Ionenselektivität bei verschiedenen extrazellulären Puffern ($pH_o=7.2$, 0 mV, 550 nm, zusätzlich jeweils mit 1.0 mM MgCl₂ und 0.1 mM CaCl₂, n=5 bei allen Puffern außer bei CsCl mit n=3). D: Aktionsspektrum sowohl ohne (n=5) als auch mit all-trans-Retinal (5 µM Endkonzentration, 0 mV, $pH_o=7.2$, n=7). Der Bildeinsatz zeigt die absoluten stationären Photostrom-Amplituden, welche bei ATR deutlich dominieren (ohne ATR n=21, mit ATR n=16). E-G: Untersuchung der bi-exponentiellen *off*-Kinetik von CsR nach stationärer Belichtung ($pH_o=7.2$, alle n=13). Die Werte wurden mit der Software Clampfit 10 gefittet, wobei das Downhill-Simplex-Verfahren mit 500 Wiederholungen angewandt wurde. Es wurde nur die Zeitspanne bis 560 ms nach der Belichtung für den Fit verwendet, damit die schnelle Komponente nicht unterrepräsentiert wurde. E und F: Spannungsabhängigkeit der schnellen und langsamen τ -Konstante. G: Prozentualer Anteil der beiden Zeitkomponenten am stationären Gesamtstrom. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Die bi-exponentielle *off*-Kinetik des stationären Stromes von CsR ist besonders bei negativen Spannungen zu sehen (Abbildungen 31A und B). Hierbei ist die schnellere Zeitkomponente spannungsunabhängig und schnell ($\tau_{fast}=4$ ms, Abbildung 31E). Dagegen ist die zweite Zeitkomponente langsamer und sehr spannungsabhängig ($\tau_{slow}=260$ ms bei -125 mV, 25 ms bei +75 mV, Abbildung 31F). Von beiden Zeitkomponenten spielt die spannungsabhängige Komponente mit circa 70 % Anteil am gesamten Photostrom die dominierende Rolle (Abbildung 31G). All diese Beobachtungen stimmen mit denen von BR überein, welche bereits im Abschnitt 1.2.2 der Einleitung genannt, näher erläutert und interpretiert wurden. Darüber hinaus wurde als Kontrolle auch die

Ionenselektivität von CsR bei verschiedenen extrazellulären Pufferbedingungen getestet, wobei wie erwartet kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abbildung 31C).

Eine sehr bedeutende Beobachtung konnte bei der erweiterten Untersuchung der Aktionsspektren von CsR in Abbildung 31D gemacht werden. So zeigte CsR unter Zugabe von all-*trans*-Retinal (ATR) in den ORI-Puffer (Puffer für die Inkubation nach der Injektion, siehe Tabelle 9) ein Maximum von 542 nm. Interessanterweise war das Aktionsspektrum um circa 10 nm rotverschoben, wenn kein ATR hinzugegeben wurde. Ohne ATR waren jedoch auch die absoluten Stromamplituden reduziert. Wahrscheinlich wird dieser Effekt durch endogenes (3,4)-Didehydroretinal in Oozyten verursacht [134, 135]. Diese Beobachtung könnte die Unterschiede in den Stromamplituden und Spektren aus Oozyten und HEK-Zellen anderer mikrobieller Rhodopsine erklären (siehe Abbildung 10, Abbildung 17 und Abbildung 19).

2.3.2 Intrazellulärer Halbkanal von CsR

Die Position CsR-T46 wurde untersucht, weil diese Position in den meisten Protonenpumpen mit einem Thr oder Ser konserviert ist (Abbildung 24), jedoch nicht zum Beispiel im *Acetabularia*-Rhodopsin-1, welches an dieser Position ein Asparagin besitzt [42]. Aufgrund der Sequenzhomologie von BR und CsR ist davon auszugehen, dass CsR-D97 (\cong BR-D96) als Protonendonor fungiert und mit CsR-T46 (\cong BR-T46) über eine Wasserstoffbrückenbindung interagiert. Die Mutanten CsR-T46N/Q waren beide funktional (Abbildung 32).

Das Besondere an der Mutanten CsR-T46N/Q ist, dass die stationären Ströme eine geringere Spannungsabhängigkeit und eine erhöhte Pumpkraft im Vergleich zum CsR-WT aufweisen, wenn die Umkehrpotentiale linear extrapoliert werden (Abbildung 41C). Ein besonderes Charakteristikum von CsR-WT gegenüber anderen Pumpen war, dass die Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme von allen untersuchten Protonenpumpen am größten war (siehe hierzu Abbildung 13). Die Mutation T46N in CsR führt offenbar letztendlich dazu, dass die Spannungsabhängigkeit von CsR ähnlicher zu der von anderen Protonenpumpen wird (Abbildung 41D). Andere Mutationen an dieser Stelle (CsR-T46A/S) verhielten sich wie CsR-WT und sind daher nicht gezeigt.

Interessanterweise verhielt sich die Mutante CsR-D97E weitestgehend wie CsR-WT (Abbildungen 32C und F). Die entgegengesetzte Mutation in Pumpen vom PR-Typ (\cong GR-E132D bzw. GPR-E108D) hatte tiefgreifende Änderungen bewirkt (siehe die Einleitung zu Abschnitt 2.3).

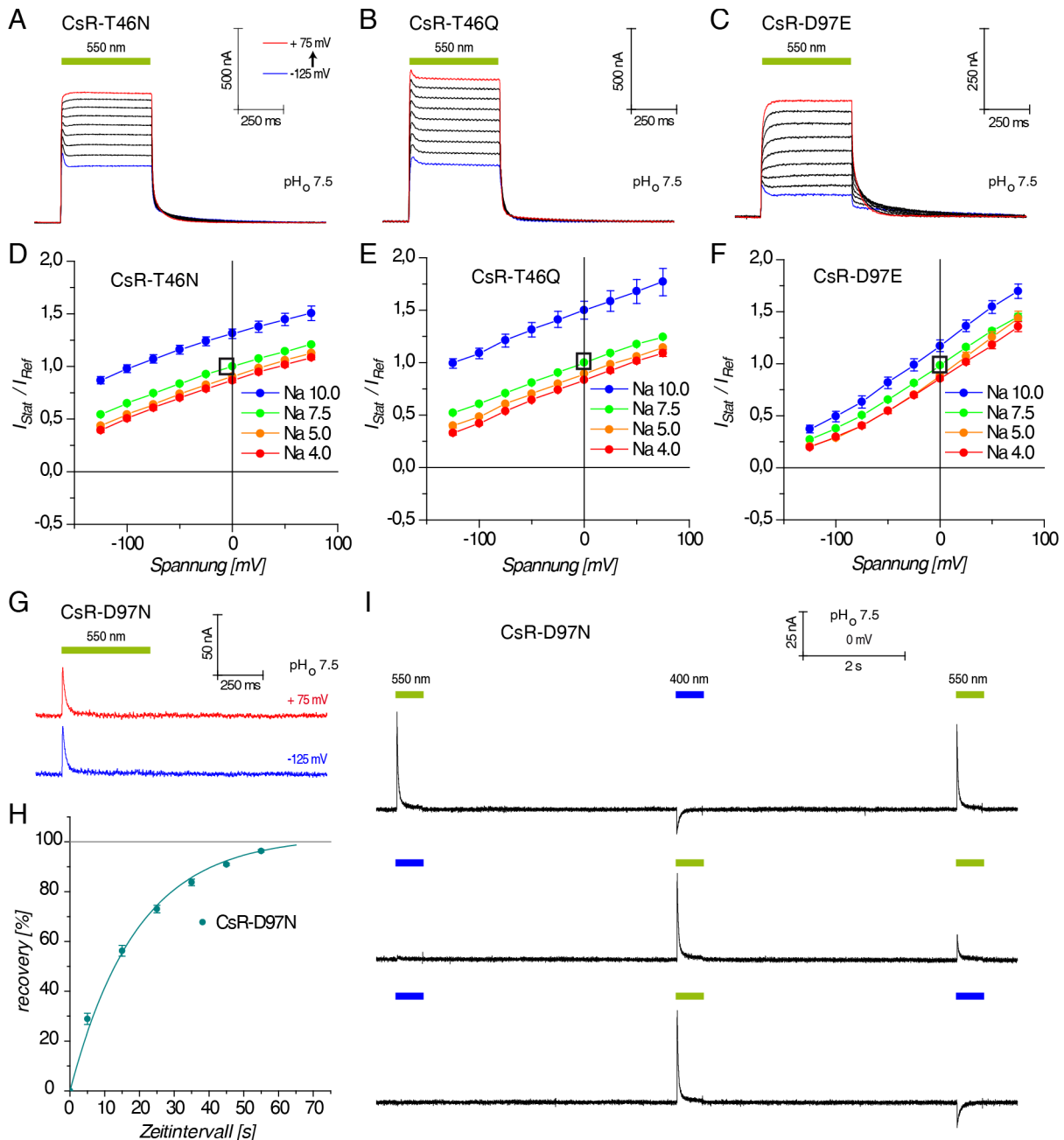


Abbildung 32: Untersuchung des intrazellulären Halbkanales von CsR. Die Oozyten wurden jeweils mit 550 nm für 500 ms bei verschiedenen Spannungen belichtet. A-C: Stromspuren der Mutanten bei verschiedenen pH_o-Werten. D-F: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme. Die Referenz-Bedingungen für die Normalisierungen sind jeweils mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o=[10/7.5/5/4] mit n_{T46N}=[4/9/4/4], n_{T46Q}=[6/27/6/2], n_{D97E}=[5/9/4/5]. G. Typische Stromspuren von CsR-D97N bei Belichtung für je 500 ms. H: Doppelpulsexperiment analog zu Abbildung 29A für CsR-D97N (pH_o=7.5, 0 mV, 550 nm, 110 s Wartezeit nach jeder Doppelbelichtung, n=4). I: Stromspuren von CsR-D97N zeigen, dass ein negativer Peak-Strom mit blauem Licht nach vorheriger Belichtung mit grünem Licht beobachtet werden kann (pH_o=7.5, 0 mV, 5 s zwischen jedem Filterwechsel). Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Die Mutante CsR-D97N zeigte die gleichen Effekte wie die identische Mutation in BR [41]. CsR-D97N ist durch positive Peak-Ströme gekennzeichnet, welche keine erkennbare Spannungsabhängigkeit zeigen (Abbildung 32G). Ein stationärer Photostrom ist unter grünem Dauerlicht nur minimal zu beobachten. Der gesamte Photozyklus von CsR-D97N wurde mit Doppelpulsexperimenten untersucht und ist mit insgesamt circa 65 Sekunden sehr langsam (Abbildung 32H). Ein entgegengesetzter negativer Peak-Strom kann mit blauem Licht innerhalb dieser 65 Sekunden beobachtet werden. Der negative Peak-Strom ist nur bei vorheriger Belichtung mit Grünlicht zu sehen (Abbildung 32I).

Die hier gezeigten Beobachtungen sind im Einklang mit der Interpretation für BR-D96N [136, 137]: zuerst wird ein Proton von der PRSB an den primären Protonenakzeptor übertragen (=positiver transienter Peak-Strom als intramolekulare Ladungsverschiebung) und es bildet sich das blaue M-Intermediat. Die RSB kann in BR-D96N jedoch nicht von der intrazellulären Seite reprotoniert werden und das M-Intermediat ist langlebiger. Hierdurch ist auch der gesamte Photozyklus verlangsamt. Somit zeigt CsR-D97N, dass diese Position wie in BR als der primäre Protonendonor fungiert.

2.3.3 Gegenion-Komplex und benachbarte Positionen in CsR

Der primäre Protonenakzeptor spielt eine zentrale Rolle und ist daher in allen Protonenpumpen als ein Asp (BR-D85) hoch konserviert. Daher sollten Mutationen des primären Protonenakzeptors und der umliegenden Positionen zu starken Beeinträchtigungen in der Funktionalität führen. Zwar wurden entsprechenden Mutanten in anderen Protonenpumpen bereits untersucht, aber auch kontrovers diskutiert. In der Diskussion im Abschnitt 3.2.2 wird die entsprechende Literatur mit einbezogen. CsR bot mit seinen großen Stromamplituden im Vergleich zu BR eine bessere Möglichkeit diese Position zu untersuchen. Im Folgenden werden daher einige Mutanten des Gegenion-Komplexes von CsR vorgestellt.

Für die Untersuchung des primären Protonendonors fokussierten sich die Experimente auf CsR-D86T. Bei Belichtung mit grünem Licht zeigt CsR-D86T einen deutlichen negativen Peak-Strom, welcher bei negativen Spannungen und niedrigen pH_o -Werten am stärksten ausgeprägt ist (Abbildung 33A). Unmittelbar nach Ende der Belichtung folgt stets ein entgegengesetzter positiver Peak-Strom. Diese Beobachtung wäre damit zu erklären, dass eine intramolekulare Ladungsverschiebung zu der intrazellulären Seite ohne Netto-Pumpstrom erfolgt. Im Gegensatz dazu führt die Belichtung mit blauem Licht zu stationären Strömen, welche bei positiven Spannungen und hohen pH_o -Werten am stärksten ausgeprägt sind. Mit blauem Licht sind jedoch auch schwache einwärts gerichtete stationäre Ströme bei negativen Spannungen und niedrigen pH_o -Werten zu beobachten. Das Maximum im Aktionsspektrum für die stationären Ströme liegt bei 412 nm, während die Peak-Ströme bei 585 nm maximal angeregt werden (Abbildung 33B). Wenn CsR-D86T mit dem 400-600 nm Filter belichtet wird, dann sind sowohl Peak-Ströme als auch stationäre Ströme zu beobachten.

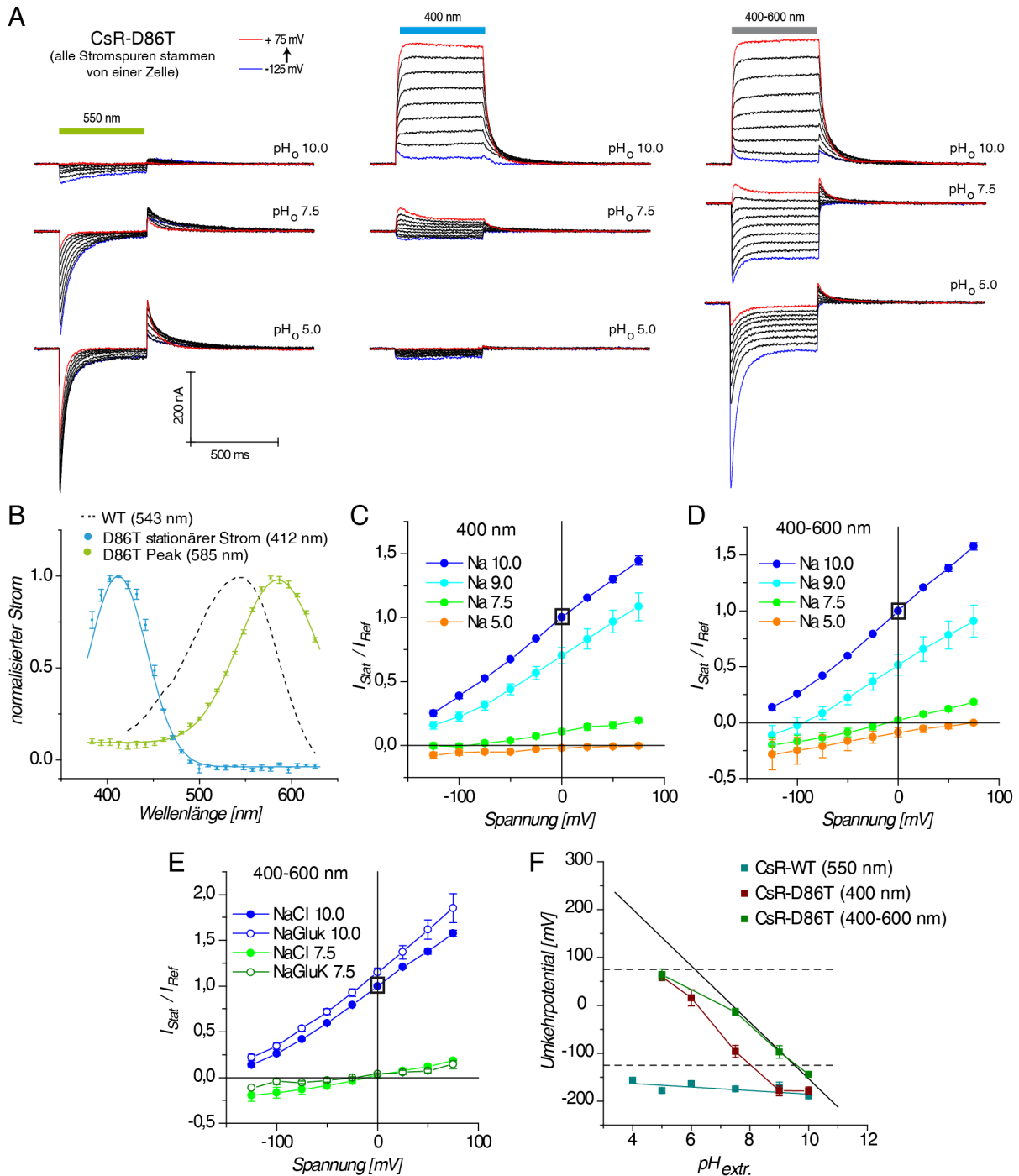


Abbildung 33: Untersuchung des primären Protonenakzeptors von CsR anhand der Mutante D86T. A: Stromspuren der Mutante bei verschiedenen Belichtungen, Spannungen und pH_o-Bedingungen. Alle hier gezeigten Stromspuren wurden an einer einzigen sehr guten Oozyte gemessen. B: Aktionsspektrum der stationären Photoströme bei pH_o=10 und 0 mV (n=4) im Vergleich zu den Peak-Strömen bei pH_o=7.5 und 0 mV (n=4). Als Referenz ist das Spektrum von CsR-WT aus Abbildung 10 als gestrichelte Linie gezeigt. C-D: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme bei Belichtung mit blauem (400 nm) oder weißem Licht (400-600 nm). Die Referenz-Bedingungen für die Normalisierungen sind jeweils mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o=[10/9/7.5/5] mit n_{400nm}=[13/6/8/5], n_{400-600nm}=[22/5/11/5]. E: Austausch von NaCl mit Na-Glukonat (je 100 mM) zur Untersuchung der stationären Ströme auf einen potentiellen einwärts gerichteten Chlorid-Transport. Na-Glukonat: pH_o=[10/7.5] mit n_{400-600nm}=[10/5]. F: Vergleich der Umkehrpotentiale der stationären Ströme. Die Werte vom WT sind linear gefittet (Daten aus Abbildung 15), während die Punkte für die Mutante ohne Fit verbunden wurden. pH_o=[10/9/7.5/6/5] mit n_{400nm}=[14/6/12/4/7], n_{400-600nm}=[24/5/14/0/8]. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Interessanterweise unterscheiden sich die stationären Ströme bei der Belichtung mit 400 nm im Vergleich zu der Belichtung mit 400-600 nm (Abbildungen 33A, C und D). So sind die einwärts gerichteten stationären Ströme bei Belichtung mit 400-600 nm deutlich ausgeprägter. Der Vergleich der Umkehrpotentiale der stationären Ströme zeigt deutlich, dass die Belichtung mit 400-600 nm zu weitestgehend reinen passiven Protonenströmen führt, während die Umkehrpotentiale bei 400 nm keinen reinen passiven Protonenstrom entsprechen (Abbildung 33F). Daraus ist zu schließen, dass in CsR-D86T erst über einen Zwei-Photonenprozess ein rein passiver Protonentransport bewirkt wird. Interessanterweise wurden die hier beschriebenen Eigenschaften der Mutante CsR-D86T auch in GR-D121T (siehe Abbildung 27C) und im „Green-Proteorhodopsin“ (Δ GPR-D97T) beobachtet [55]. Die CsR-Pumpe bot die Möglichkeit, diese Effekte genauer zu untersuchen.

Aus früheren BR-Experimenten wurde geschlossen, dass BR-D85T Chlorid-Ionen nach innen pumpt [103, 104]. Eine solche Chlorid-Pumpaktivität konnte für CsR-D86T unter den hier gemessenen Bedingungen nicht beobachtet werden (Abbildung 33E). Hierfür wurden die 100 mM NaCl im extrazellulären Puffer mit 100 mM Na-Glukonat ausgetauscht. Ein Chlorid-Transport wurde auch für die entsprechende Mutante im „Green-Proteorhodopsin“ (D97T) ausgeschlossen [55].

Auch die Mutante CsR-D86N zeigte bei grünem Licht ausschließlich transiente Peak-Ströme, während mit blauem Licht stationäre Ströme zu beobachten waren (Abbildung 34A). Aufgrund der ähnlichen Effekte wie bei CsR-D86T wurde auf eine intensivere Untersuchung von CsR-D86N verzichtet.

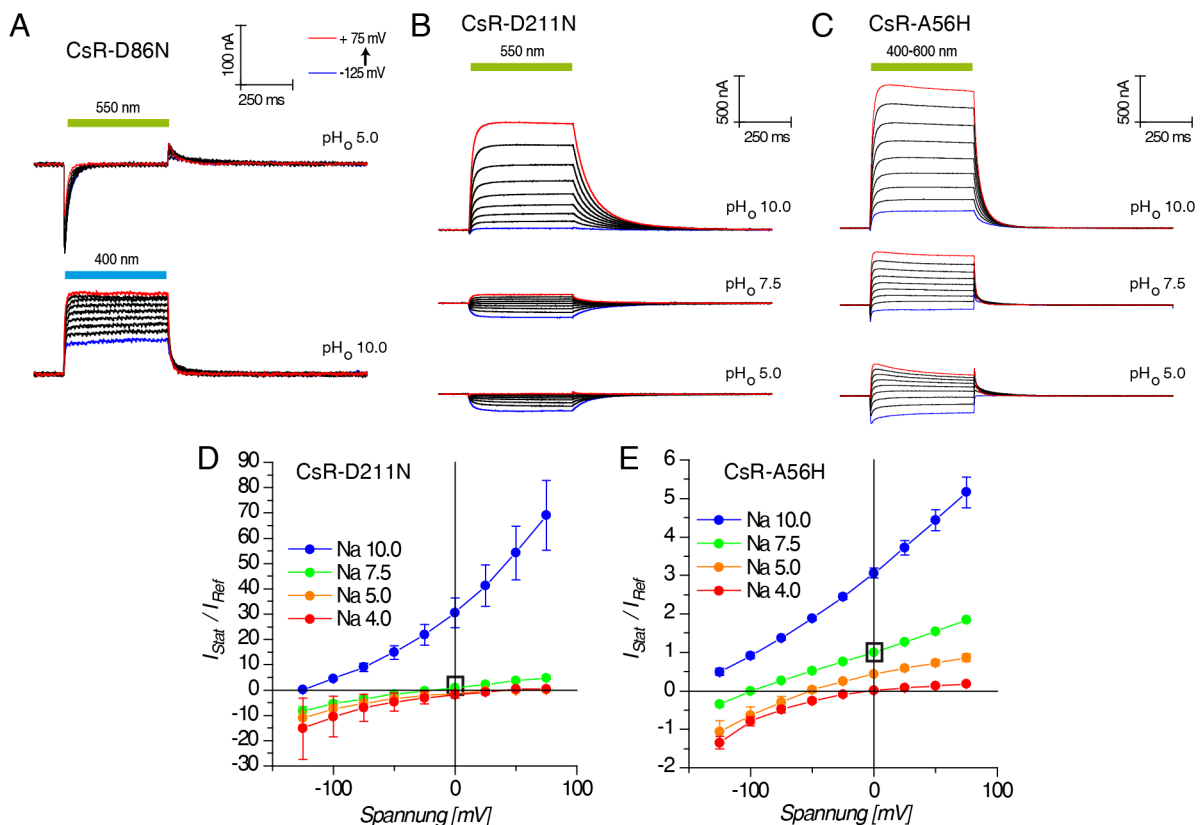


Abbildung 34: Erweiterte Untersuchung des primären Protonendonors und umgebender Positionen. Die Positionen A56 und D211 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Protonendonor D86. A: Exemplarische Stromspuren der Mutante CsR-D86N zeigen, dass sich D86T und D86N grundsätzlich gleich verhalten. B: Die Mutante CsR-D211N zeigt je nach elektrochemischem Gradient sowohl aus- als auch einwärts gerichtete Photoströme. C: Die Mutante CsR-A56H zeigt auch einwärts gerichtete Photoströme. C und D: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme der Mutanten D211N und A56H. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o=[10/9/7.5/5] mit n_{D211N} =[8/9/8/2], n_{A56H} =[5/12/4/5]. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Im Weiteren wurden zwei Positionen mutiert, welche in der unmittelbaren Nähe zum primären Protonenakzeptor CsR-D86 liegen. Hierzu zählt das hoch konservierte CsR-D211 (\triangle BR-D212), welches potentiell als alternativer Protonendonator fungieren könnte und zusammen mit CsR-D86 und einem Wassermolekül den unmittelbaren Gegenion-Komplex bilden. Als zweite Position wurde CsR-A56 (\triangle BR-M56) untersucht. Diese Position ist in Pumpen vom BR-Typ nicht konserviert. Zwar ist die Position CsR-A56 in Abbildung 30 mit eingezeichnet, jedoch wird der Abstand von CsR-A56 zu anderen Resten vom Gegenion-Komplex erst in Abbildung 24D (dort als BR-M56) deutlich. CsR-A56 sollte daher nur mit CsR-D86 direkt interagieren können. Die ursprüngliche Motivation für die Mutante CsR-A56H war, dass in den Pumpen vom PR-Typ an dieser Position ein Histidin hoch konserviert vorliegt (\triangle GR-H87). Für GR konnte jedoch gezeigt werden, dass das Histidin keine entscheidende Rolle für die einwärts gerichteten Ströme bei GR spielt (Abbildung 27).

Interessanterweise zeigen sowohl CsR-D211N als auch CsR-A56H in den Abbildungen 34B-E einwärts gerichtete stationäre Photoströme, aber unterscheiden sich in ihren Kinetiken. Beim Übergang von auswärts zu einwärts gerichteten Photoströmen sind bei beiden Mutanten Peak-Ströme zu sehen. Eine vergrößerte Darstellung der Peak-Ströme von CsR-D211N ist in der Diskussion in Abbildung 62B gezeigt. Bei den Mutanten CsR-D211N und CsR-A56H konnten keine Hinweise gefunden werden, dass die stationären Ströme durch Blaulicht oder durch einen Zwei-Photonen-Prozess begünstigt beziehungsweise verursacht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Gegenion-Komplex eine zentrale Rolle bei der der Aufrechterhaltung aktiver Pumpströme in CsR-WT spielt. Für rein passive stationäre Photoströme in den Mutanten CsR-D86N/T ist es offenbar notwendig, dass die Schiff-Base bereits im Grundzustand deprotoniert vorliegt. Dies kann entweder durch einen hohen pH_o -Wert oder durch vorherige beziehungsweise gleichzeitige Belichtung mit grünem Licht bewirkt werden.

2.3.4 Extrazellulärer Halbkanal von CsR

Unmittelbar an den Gegenion-Komplex in Protonenpumpen grenzen weitere teils hoch konservierte Positionen aus dem extrazellulären Halbkanal. Die Unterteilung der Mutanten in Gegenion-Komplex und extrazellulärer Teil dient vorrangig der Übersichtlichkeit, jedoch interagieren die meisten der hier vorgestellten Positionen ebenfalls direkt oder indirekt über Wassermoleküle mit dem Gegenion CsR-D86.

Vor allem das Arginin an Position von BR-R82 ist in mikrobiellen Rhodopsinen hoch konserviert. Daher wurde diese Position in CsR mit Hilfe der Mutationen R83Q und R83K untersucht (Abbildungen 35A und B). Beide Mutanten waren funktional und zeigten auswärts, aber auch einwärts gerichtete Photoströme. Hierbei war CsR-R83Q im Vergleich zu allen anderen Mutanten besonders auffällig, weil die einwärts gerichteten Stromamplituden mit mehreren tausend nA besonders ausgeprägt waren und dies trotz verlangsamter Photozykluskinetik. Deswegen kann angenommen werden, dass bei CsR-R83Q mehrere Protonen pro Photozyklus transportiert werden.

Motiviert durch CsR-R83Q wurde überlegt, welche Unterschiede in dieser Region zwischen Pumpen und Kanalrhodopsinen existieren (siehe hierfür Abbildung 66). Direkt neben CsR-R83 befindet sich eine weitere besonders interessante Position, nämlich das Tyrosin CsR-Y207 (\triangle BR-F208). Diese Position ist in Protonenpumpen als aromatische Aminosäure hoch konserviert. In allen PR-Typ

Pumpen befindet sich hier ein Tyrosin. In BR und Arch-3 findet sich hier ein Phenylalanin. Somit ist CsR mit dem Tyrosin an dieser Position keine typische Pumpe vom BR-Typ, sondern ähnelt mehr dem PR-Typ. In den Kationen leitenden Kanalrhodopsinen ist diese Position CsR-Y207 als Histidin (\triangle Chr2-H249) konserviert. Für CsR wurde die Mutante CsR-Y207H getestet und diese zeigt ebenfalls einwärts gerichtete Photoströme (Abbildung 35C).

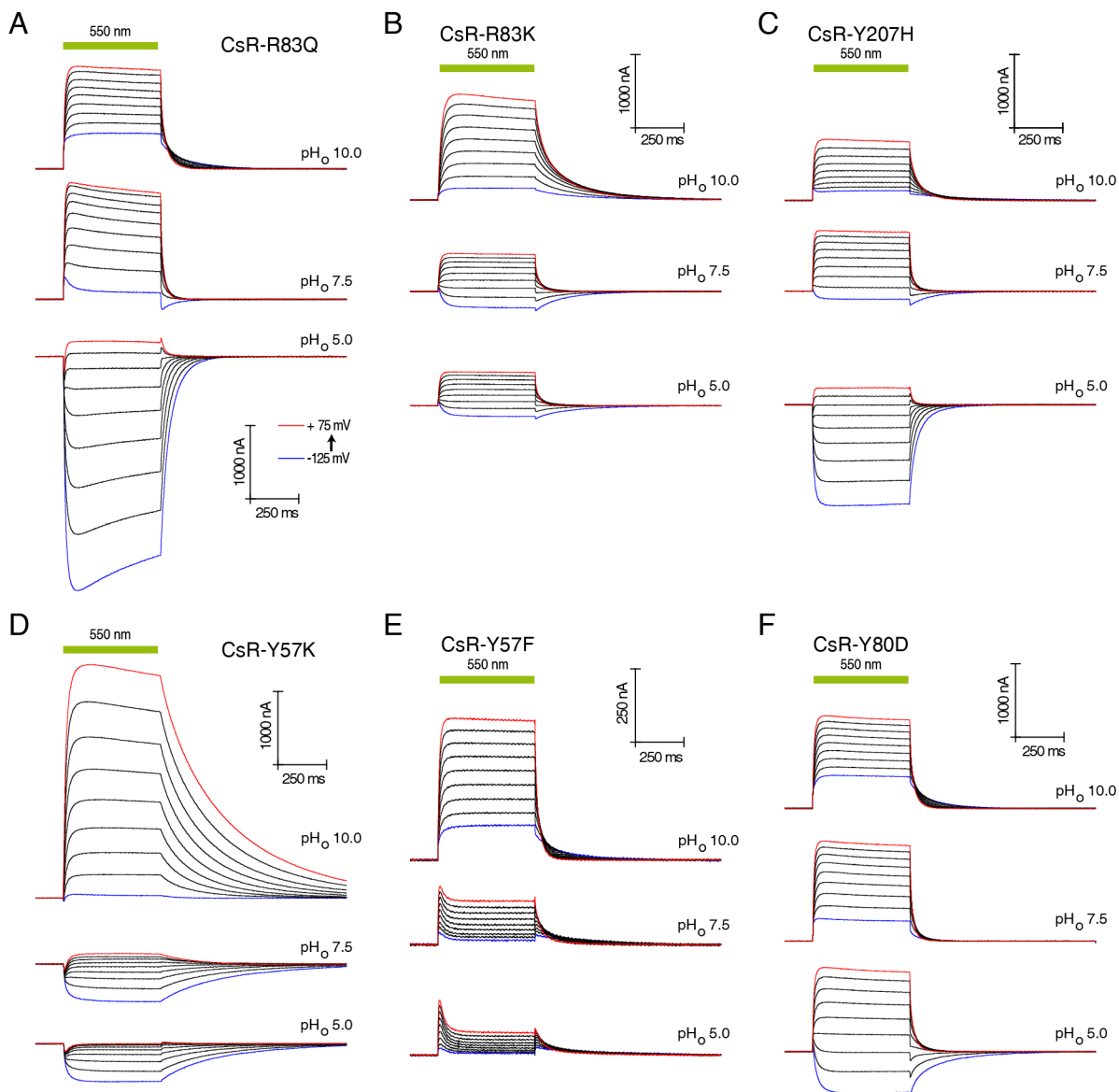


Abbildung 35: Untersuchung potentiell wichtiger Positionen zwischen dem Gegenion-Komplex und der extrazellulären Seite von CsR. Gezeigt sind jeweils exemplarische Stromspuren der Mutanten. Weitere Details sind im Text aufgeführt.

Beim Vergleich der Kristallstrukturen von C1C2 und BR fällt eine weitere interessante Position auf (Abbildung 66). Im extrazellulären Halbkanal befindet sich in den Kation-Kanalrhodopsinen ein Lysin (\triangle Chr2-K93), welches in allen Protonenpumpen als ein Tyrosin hoch konserviert ist (\triangle BR-Y57, CsR-Y57). Die Mutante CsR-Y57K zeigt ebenfalls einwärts und auswärts gerichtete Photoströme (Abbildung 35D). Im Gegensatz zu CsR-R83Q dominieren jedoch die auswärts gerichteten Ströme deutlich und erreichen mehrere tausend nA. Bei der eher konservativen Mutation CsR-Y57F zeigen sich unter den gemessenen Bedingungen jedoch nur auswärts gerichtete Photoströme (Abbildung 35E). Die Mutante CsR-Y57N wurde ebenfalls getestet, jedoch war diese nicht funktional.

Zuletzt wurde die Mutante CsR-Y80D (\triangle BR-Y79) getestet. Die Motivation für CsR-Y80D war, dass in den Pumpen vom PR-Typ an dieser Stelle ein Aspartat (\triangle GR-D115) konserviert ist. CsR-Y80D zeigte einwärts gerichtete Photoströme (Abbildung 35F) und ähnelte damit GR-WT und GR-D115N (Abbildungen 26A und D).

Bei der Betrachtung der Strom-Spannungsdiagramme der Mutanten aus dem extrazellulären Halbkanal von CsR fallen besonders zwei Merkmale auf (Abbildung 36). So zeigen CsR-R83Q und CsR-Y207H grundsätzlich eine ähnliche Strom-Spannungsabhängigkeit. Zweitens ähnelt CsR-Y57K eher den Mutanten CsR-D211N und CsR-A56H aus Abbildung 34.

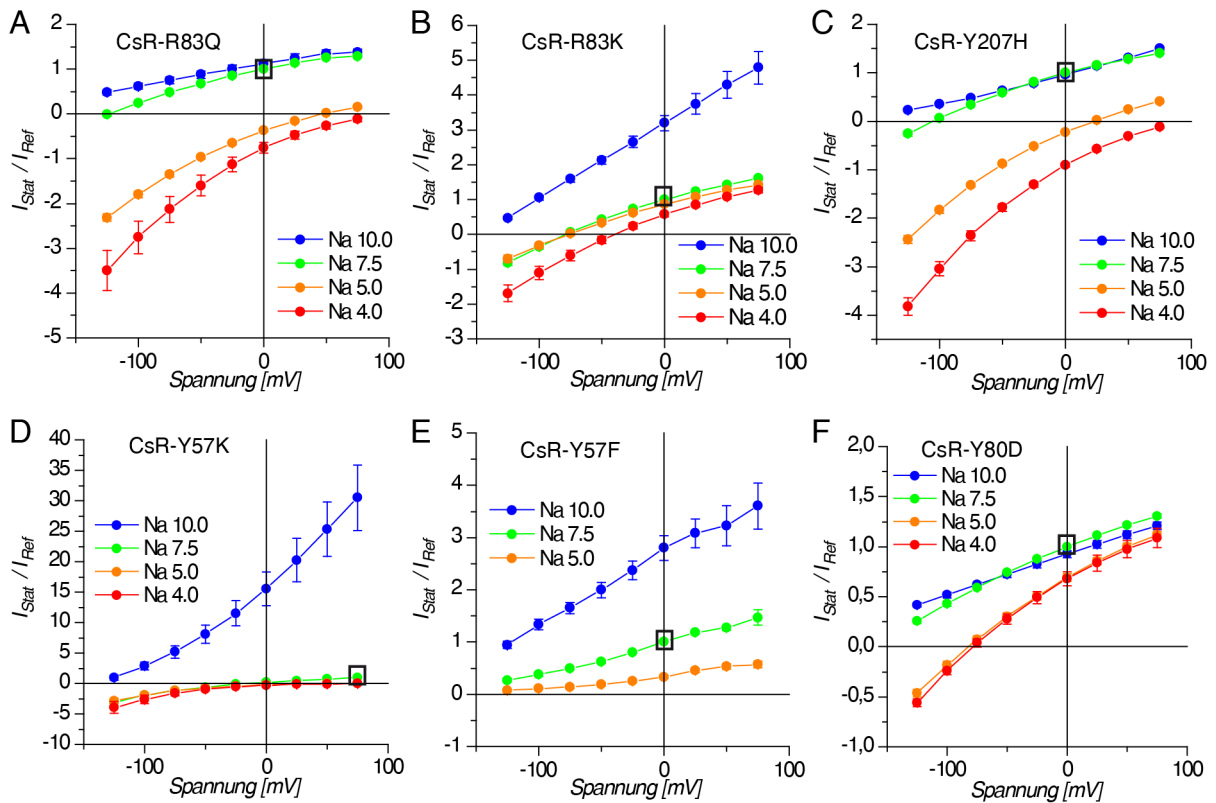


Abbildung 36: Strom-Spannungskurven der Mutanten aus Abbildung 35. Es wurden jeweils die stationären Ströme ausgewertet. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{R83Q}=[7/11/6/4]$, $n_{R83K}=[6/8/5/5]$, $n_{Y207H}=[4/4/4/4]$, $n_{Y57K}=[9/12/6/3]$, $n_{Y57F}=[9/13/8/0]$, $n_{Y80D}=[4/9/4/4]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

2.3.5 Extrazelluläre Glutamate der Pumpen vom BR-Typ

Auf der extrazellulären Seite befinden sich zwei Glutamate, welche in Pumpen vom BR-Typ konserviert sind (\triangle BR-E194 und BR-E204) und deren Rolle vielseitig in der Literatur als Teil der „proton-release-group“ diskutiert wurde [138-142]. Die Mutanten CsR-E193Q und CsR-E203Q in Abbildung 26 zeigen jedoch, dass die Neutralisierung dieser Aminosäuren im Vergleich zu den vorherigen Mutanten nur eine geringe Änderung der Stromspuren und Strom-Spannungsabhängigkeiten zeigt. Unterschiede zu CsR-WT finden sich in der Ausprägung des transienten Peak-Stromes und in der Kinetik.

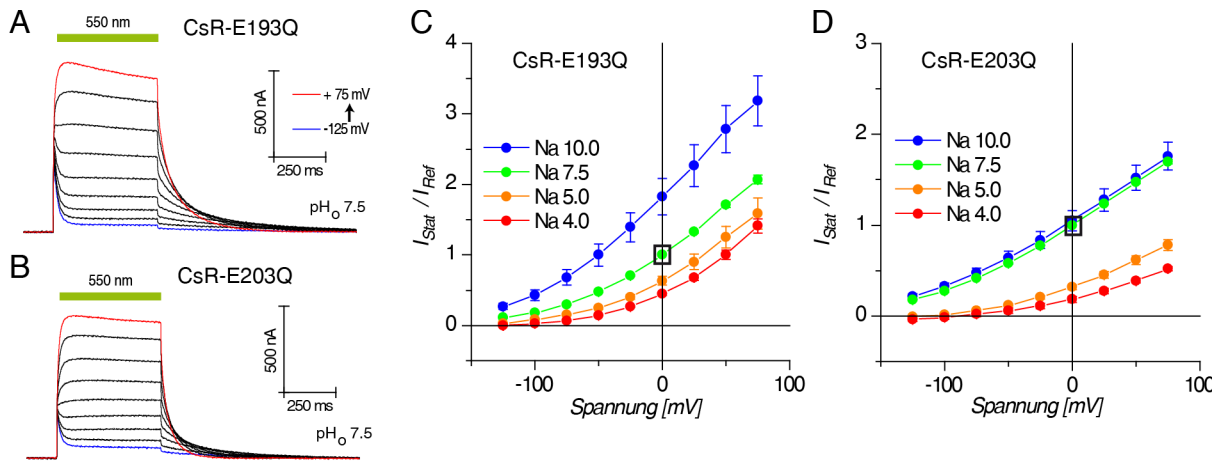


Abbildung 37: Untersuchung der extrazellulären Glutamate von CsR. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $pH_O = [10/7.5/5/4]$ mit $n_{E193Q} = [8/11/4/4]$ und $n_{E203Q} = [5/7/3/2]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

2.3.6 Mutanten der Retinal-Bindetasche

Als letzten Bereich in CsR wurden Positionen der Retinal-Bindetasche untersucht. Bisher existierten keine elektrophysiologischen Daten in nativen Membranen zu den hier untersuchten Positionen.

Die beiden Mutanten CsR-M119T und CsR-W182F (\triangle BR-M118 und BR-W182) zeigten stationäre auswärts gerichteten Photoströme (Abbildung 38), welche ähnlich wie CsR-WT sehr spannungsabhängig und gering pH_O -abhängig waren. Im Gegensatz zum WT reduzierte sich die Spannungsabhängigkeit bei negativen Spannungen. Einwärts gerichteten Photoströme waren bei CsR-M119T und CsR-W182F unter allen getesteten Bedingungen nicht zu beobachten. Sehr auffällig waren die ausgeprägten Peak-Ströme zu Beginn der Belichtung sehr auffällig. An den Mutanten CsR-M119T und CsR-W182F wurden Doppelpulseperimente wie in Abbildung 29A durchgeführt. Der gesamte Photozyklus bei CsR-M119T war auf 3 s verlängert, während CsR-W182F sogar erst nach über 25 s in den Grundzustand zurückkehrte (Abbildungen 38G und H). Durch die verlangsamte Kinetik des gesamten Photozyklus ist es nicht verwunderlich, dass die Amplituden der stationären Ströme bei beiden Mutanten im Vergleich zu CsR-WT reduziert waren.

Zusätzlich wurden die Mutanten mit Belichtungsexperimente wie bei CsR-D97N in Abbildung 32 untersucht, wobei die Mutanten in unterschiedlicher Reihenfolge mit Grün- und Blaulicht belichtet wurden. Die Ergebnisse sind exemplarisch für CsR-W182F in Abbildung 38I gezeigt. Es konnten wie bei CsR-D97N negative transiente Ströme beobachtet werden, wenn die Mutanten zuvor mit grünem Licht angeregt wurden. Im Gegensatz zu CsR-D97N konnten auch bei Blaulicht schwache stationäre Ströme beobachtet werden. Aus den Experimenten lässt sich schließen, dass sich die Eigenschaften der Mutanten CsR-M119T und CsR-W182F durch ein besonders langlebiges und Blaulichtempfindliches Intermediat erklären lassen, wie dies auch bei CsR-D97N und BR-D96N der Fall war (siehe hierzu Abschnitt 2.3.2).

Die Untersuchung der Position BR-M118 mit der Mutante CsR-M119T verfolgte auch weitergehende Ziele. So entspricht diese Mutante der Position T198M in ChR1, welche im späteren Abschnitt 2.5.1 behandelt wird. Zudem führt die entsprechende Mutante T159C in ChR2 zu einer Erhöhung der Stromamplituden [95].

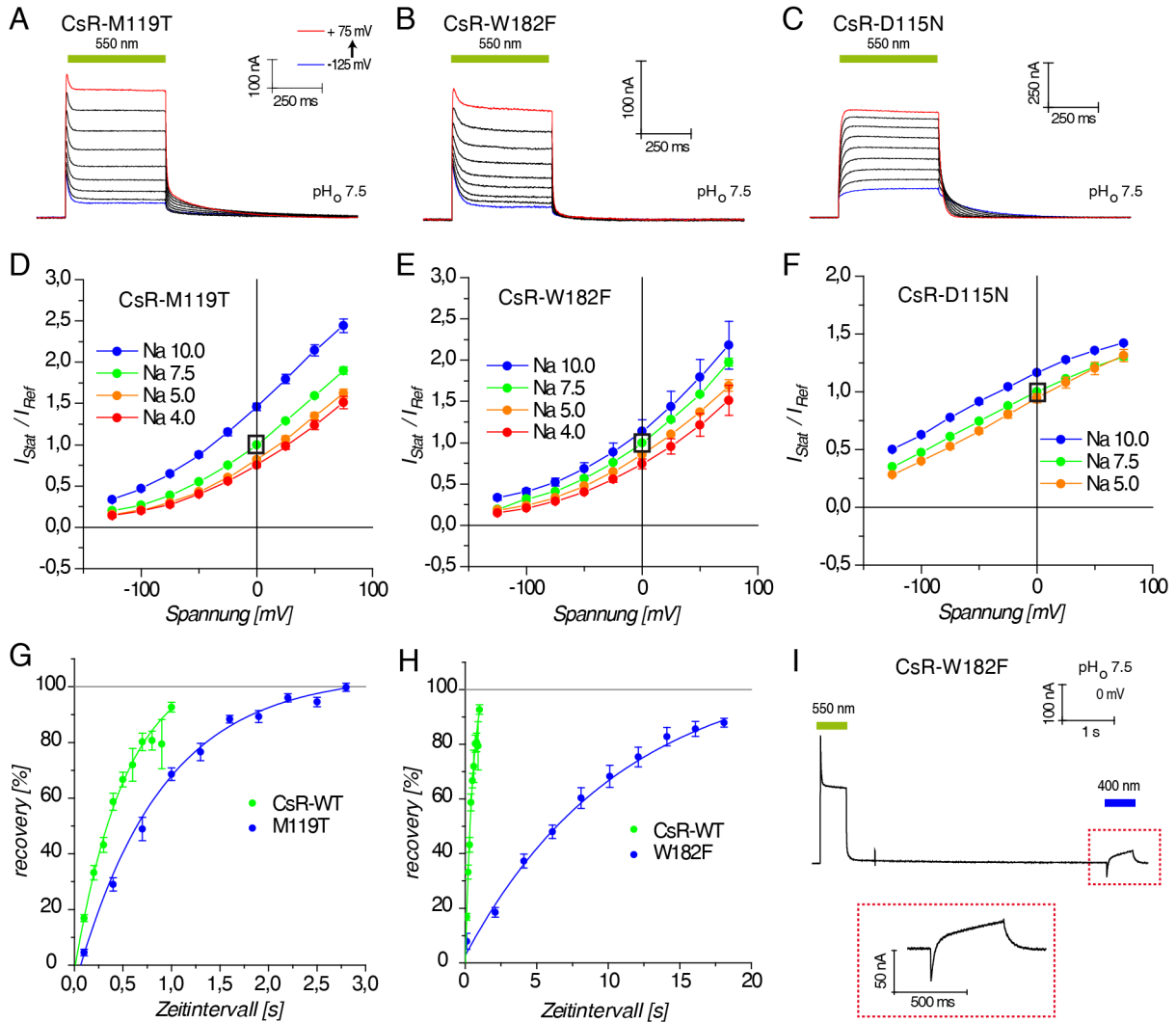


Abbildung 38: Untersuchung von Positionen an der Retinal-Bindetasche. A-C: Repräsentative Stromspuren der Mutanten. D-F: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o=[10/7.5/5/4] mit $n_{\text{M119T}}=[3/4/3/2]$, $n_{\text{W182F}}=[4/6/4/4]$ und $n_{\text{D115N}}=[3/6/2/0]$. G und H: Doppelpulsexperimente von CsR-M119T und CsR-W182F wie in Abbildung 29 (550 nm, pH_o=7.5). Die Messpunkte wurden mono-exponentiell gefittet. CsR-M119T (n=4, 15 s Pause nach jeder Doppelbelichtung) und CsR-W182F (n=5, 60 s Pause nach jeder Doppelbelichtung) wurden bei 0 mV gemessen. Die Daten für CsR-WT wurden bei -125 mV bestimmt (n=4, 15 s Pause nach jeder Doppelbelichtung), weil bei 0 mV keine Peak-Ströme mehr detektierbar waren. I: Die langen „recovery“-Zeiten von M119T und W182F werden wahrscheinlich durch ein langlebiges M-Intermediat verursacht. Hierfür wurde das Messprotokoll aus Abbildung 32 verwendet. Hier ist exemplarisch ein Ausschnitt einer Messung für CsR-W182F gezeigt. Alle Daten sind als $\text{mean} \pm \text{SE}$ angegeben.

Direkt benachbart zu CsR-M119 und CsR-W182 liegt das Aspartat CsR-D115 (\triangle BR-D115, Chr2-D156, GR-S155), welchem eine wichtige Rolle als Teil des „DC-gates“ in Chr2 zugeschrieben wird [143]. Sowohl in Pumpen des BR-Typs als auch in den meisten Kanalrhodopsinen ist dieses Aspartat konserviert (siehe hierfür Abbildung 68). Lediglich die Pumpen vom PR-Typ besitzen an der analogen Position ein Serin mit Ausnahme von ESR (\triangle ESR-D119). Die Mutante CsR-D115N zeigte jedoch keine Auffälligkeiten (Abbildungen 38C und F).

2.3.7 E_{rev} der Mutanten des Gegenion-Komplexes und des extrazellulären Halbkanales

Zusammengefasst haben alle bisherigen Experimente zu CsR gezeigt, dass der extrazelluläre Halbkanal zusammen mit dem Gegenion-Komplex entscheidend für die Aufrechterhaltung der elektromotorischen Pumpkraft sind. Die einzelnen Mutanten zeigten jedoch klare Unterschiede in der jeweiligen Stärke der verbliebenen Pumpkraft bzw. der Ausprägung der einwärts gerichteten Photoströme. Zur Beurteilung der Pumpkraft wurden wieder die Umkehrpotentiale bestimmt, welche in Abbildung 39 gezeigt sind. Bei den Mutanten wurde auf einen linearen Fit der Messpunkte verzichtet, weil einige Mutanten keine eindeutige lineare Abhängigkeit zeigten.

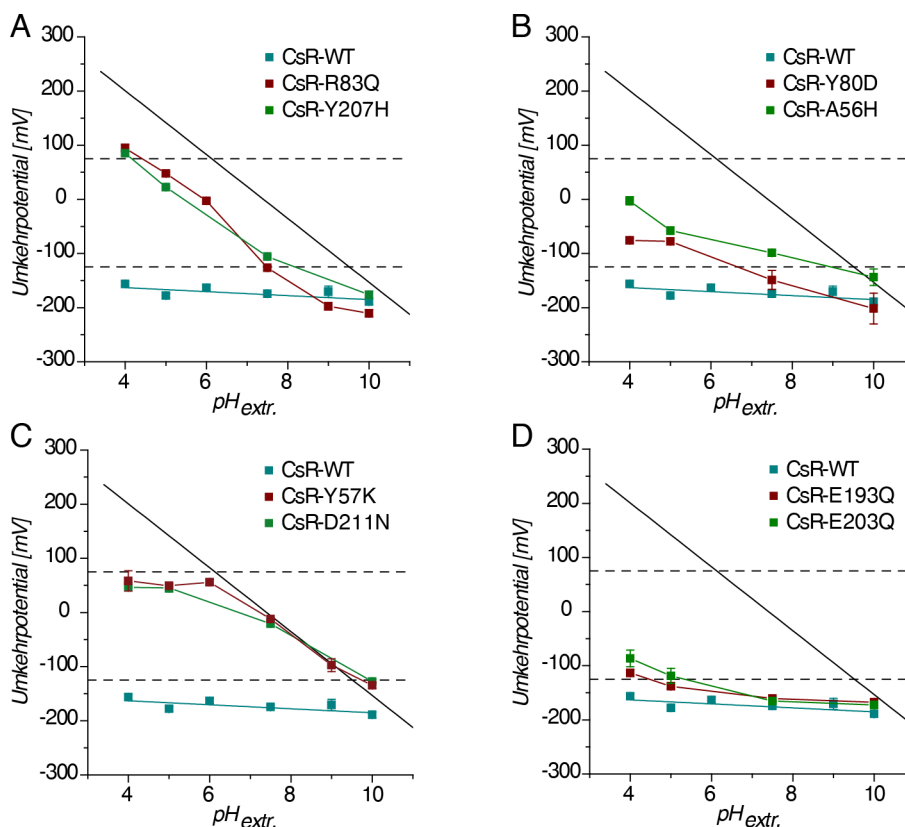


Abbildung 39: Umkehrpotentiale ausgewählter CsR-Mutanten. Die Werte vom WT sind linear gefittet (Daten aus Abbildung 15). Es wurden stets die stationären Ströme bei Belichtung mit 550 nm für 500 ms ausgewertet. $pH_o = [10/9/7.5/6/5/4]$ mit $n_{R83Q} = [7/4/11/4/6/4]$ und $n_{Y57K} = [9/2/12/2/6/3]$, $pH_o = [10/7.5/5/4]$ mit $n_{Y207H} = [4/4/4/4]$, $n_{Y80D} = [5/10/4/3]$, $n_{A56H} = [5/12/5/7]$, $n_{D211N} = [8/9/8/2]$, $n_{E193Q} = [9/12/4/3]$, $n_{E203Q} = [5/7/3/2]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Die Mutanten lassen sich anhand ihrer Umkehrpotentiale in zwei Hauptklassen einteilen:

1. Die Mutanten Y207H und R83Q zeigen eine deutliche Reduzierung der Pumpkraft (Abbildung 39A). Unter allen gemessenen Bedingungen ist eine konstante Pumpaktivität zusammen mit passivem Transport zu beobachten. Grundsätzlich ähnelt das Verhalten dieser Mutanten dem *Gloeobacter*-Rhodopsin. Auch die Mutanten Y80D und A56H gehören zu dieser Klasse, wobei deren Eingruppierung weniger eindeutig ist (Abbildung 39B).
2. Dagegen zeigen die Mutanten Y57K und D211N in Abbildung 39C ein deutlich anderes Verhalten (sowie CsR-D86T bei 400-600 nm, Abbildung 33F). Diese Mutanten sind im pH_o -Bereich von 6.0 bis 10.0 reine passive Protonentransporter. Erst bei niedrigeren pH_o -Werten zeigen diese ein anderes Verhalten. Dieses Verhalten könnte entweder als schwache

Pumpaktivität interpretiert werden oder als ein Artefakt der Auswert-Methodik (die Stromamplituden dieser Klasse sind bei niedrigen pH_o -Werten sehr schwach).

Zur Vollständigkeit sind auch die Umkehrpotentiale der extrazellulären Glutamat-Mutanten gezeigt (Abbildung 39D). Wie bereits an den Stromspuren und der IV-Diagramme zu sehen war, spielen diese Positionen für die Pumpkraft im Vergleich zu den anderen untersuchten Positionen eine untergeordnete Rolle.

2.3.8 Kombination von CsR-R83Q mit zusätzlichen Mutationen

Die Untersuchung der CsR-Mutanten hat gezeigt, dass besonders bei der Mutante CsR-R83Q einwärts gerichtete, passive Ströme zu beobachten sind, wie sie auch bei Kanalrhodopsinen auftreten. Zusätzlich deuteten die Umkehrpotentiale von CsR-R83Q darauf hin, dass weiterhin eine reduzierte Pumpaktivität existiert. Im Folgenden wurden Doppelmутanten getestet, um mehr Informationen über die mechanistischen Hintergründe von CsR-R83Q zu gewinnen.

Zuerst wurde getestet, ob die Eigenschaften von CsR-R83Q mit Y57K kombinierbar sind. Die Einzelmутante CsR-Y57K zeigte passive Photoströme ohne Pumpaktivität bei physiologischen pH_o -Werten, wobei die auswärts gerichteten Ströme besonders ausgeprägt waren (Abbildung 35D und Abbildung 39C). Die entsprechende Doppelmутante CsR-Y57K-R83Q ist funktional und zeigt sowohl ein- als auch auswärts gerichtete Ströme (Abbildungen 40A und C).

Im Gegensatz zu den Einzelmутanten ist keine „*inward-*“ oder „*outward rectification*“ (=Ionen-transport erfolgt in die einwärts oder auswärts Richtung erleichtert) zu beobachten, jedoch sind die absoluten Stromamplituden im Vergleich zu den Einzelmутanten reduziert. Die Umkehrpotentiale der Doppelmутante entsprechen denen der Einzelmутante CsR-Y57K (siehe Abbildung 39C und Abbildung 40G), wobei auch bei niedrigen pH_o -Werten eindeutig nur passive Protonenströme fließen. Der genaue Mechanismus der Doppelmутante CsR-Y57K-R83Q ist offenbar komplex, weil das Aktionsspektrum pH_o -abhängig ist (Abbildung 40F). Zudem sind die Photoströme bei $\text{pH}_\text{o}=7.5$ weitestgehend spannungsunabhängig und somit sehr schwach, was bei einem idealen passiven Protonen-Kanal nicht erwartet wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein pH_o -abhängiges Gleichgewicht zwischen zwei unterschiedlichen anregbaren und passiven Proteinzuständen vorliegt. Diese Interpretation wird im Diskussionsteil am Ende von Abschnitt 3.3.2 näher betrachtet.

Anhand der Doppelmутante CsR-R83Q-D86N wurde getestet, ob und in wie weit der primäre Protonenakzeptor eine Rolle spielt. Die Doppelmутante ist funktional und zeigt interessante Einblicke (Abbildungen 40B, D, E und G): Der passive einwärts gerichtete Protonentransport ist unabhängig vom Protonenakzeptor und kann allein mit grünem Licht aktiviert werden. Ein auswärts gerichteter stationärer Photostrom kann mit grünem Licht nicht beobachtet werden. Erst durch Belichtung mit Blaulicht sind schwache passive auswärts gerichtete Ströme sichtbar.

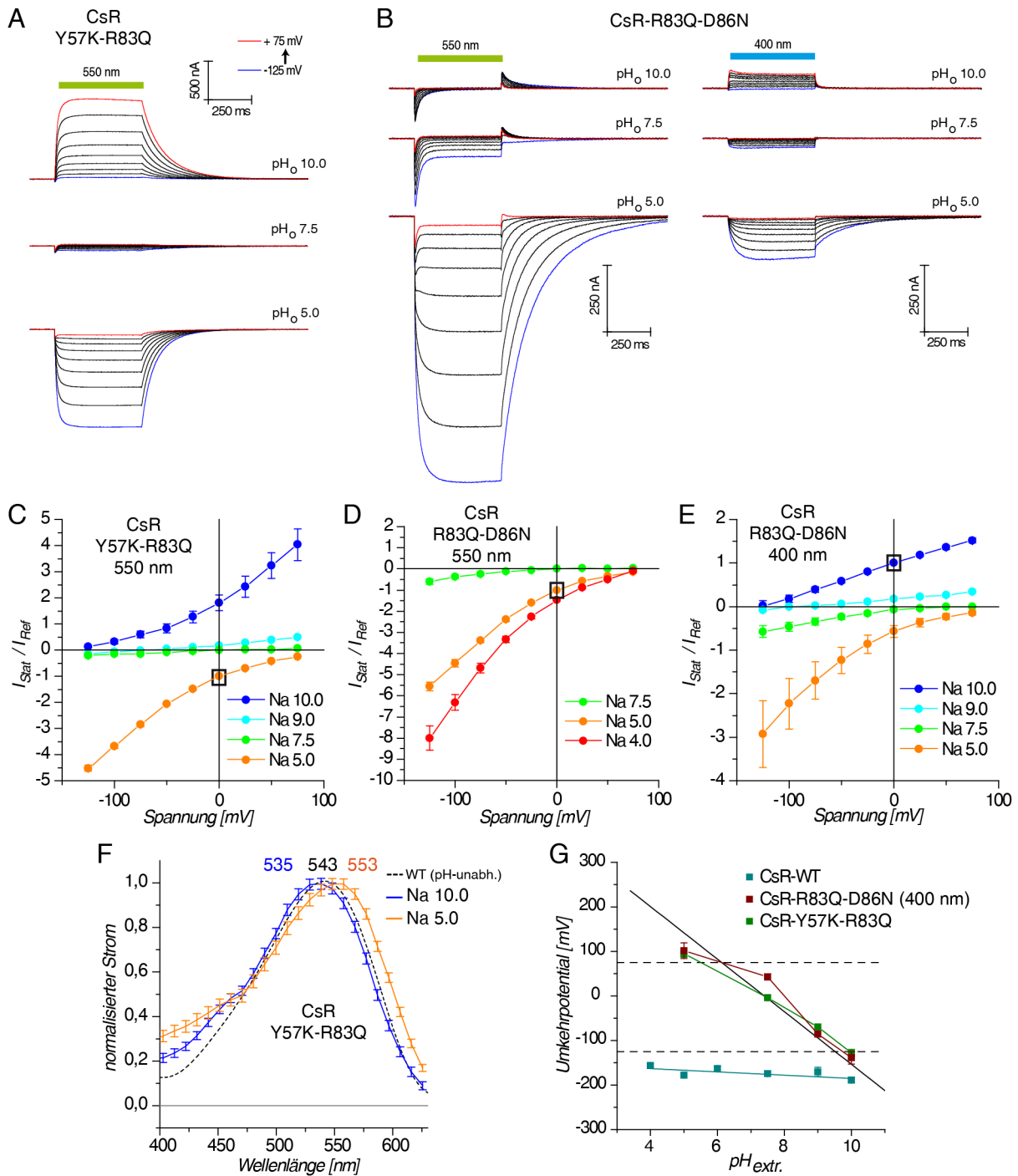


Abbildung 40: Detaillierte Untersuchung des Pump-Kanal-Dualismus von CsR-R83Q mit Hilfe von Doppelmutanten. A: Repräsentative Stromspuren von CsR-Y57K-R83Q. B: Stromspuren der Doppelmutante CsR-R83Q-D86N. Alle Stromspuren stammen von einer einzigen Oozyte und zeigen das unterschiedliche Verhalten bei Belichtung mit verschiedenen Wellenlängen. C-E: Strom-Spannungsabhängigkeit der beiden Doppelmutanten. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit dem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o=[10/9/7.5/5/4] mit n_{YK-RQ} =[10/3/10/10/0], $n_{RQ-DN-550nm}$ =[0/0/7/9/5], $n_{RQ-DN-400nm}$ =[8/2/6/5/0]. F: Das Aktionsspektrum der Doppelmutante CsR-Y57K-R83Q zeigt einen Unterschied in den Maxima bei verschiedenen pH_o-Werten (n=4, alles bei 0 mV, stationäre Ströme). CsR-WT ist als Referenz mit eingetragen und ist selbst pH_o-unabhängig. G: Umkehrpotentiale der Doppelmutanten im Vergleich zu CsR-WT. pH_o=[10/9/7.5/5] mit $n_{R83Q-D86N}$ =[7/2/6/6], $n_{Y57K-R83Q}$ =[9/3/10/10]. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Als nächstes wurde CsR-R83Q mit der Mutation T46N aus dem intrazellulären Halbkanal kombiniert. Die Ergebnisse zu der Doppelmutante sind in Abbildung 41 gezeigt. Zusammengefasst konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: die jeweiligen Effekte von T46N und R83Q verhalten sich unabhängig voneinander und können daher in der Doppelmutante kombiniert werden. Der Effekt

von T46N (Abbildung 32) war, dass die Spannungsabhängigkeit reduziert wird und somit die Pumpkraft erhöht ist (Abbildung 41C). Tatsächlich sind auch in der Doppelmutante die Umkehrpotentiale negativer als in CsR-R83Q. Hiermit lässt sich auch erklären, warum die einwärts gerichteten Ströme der Doppelmutante im Vergleich zu CsR-R83Q reduziert sind. Interessanterweise sind dafür die auswärts gerichteten Ströme in der Doppelmutante mit circa 2000 nA sehr groß.

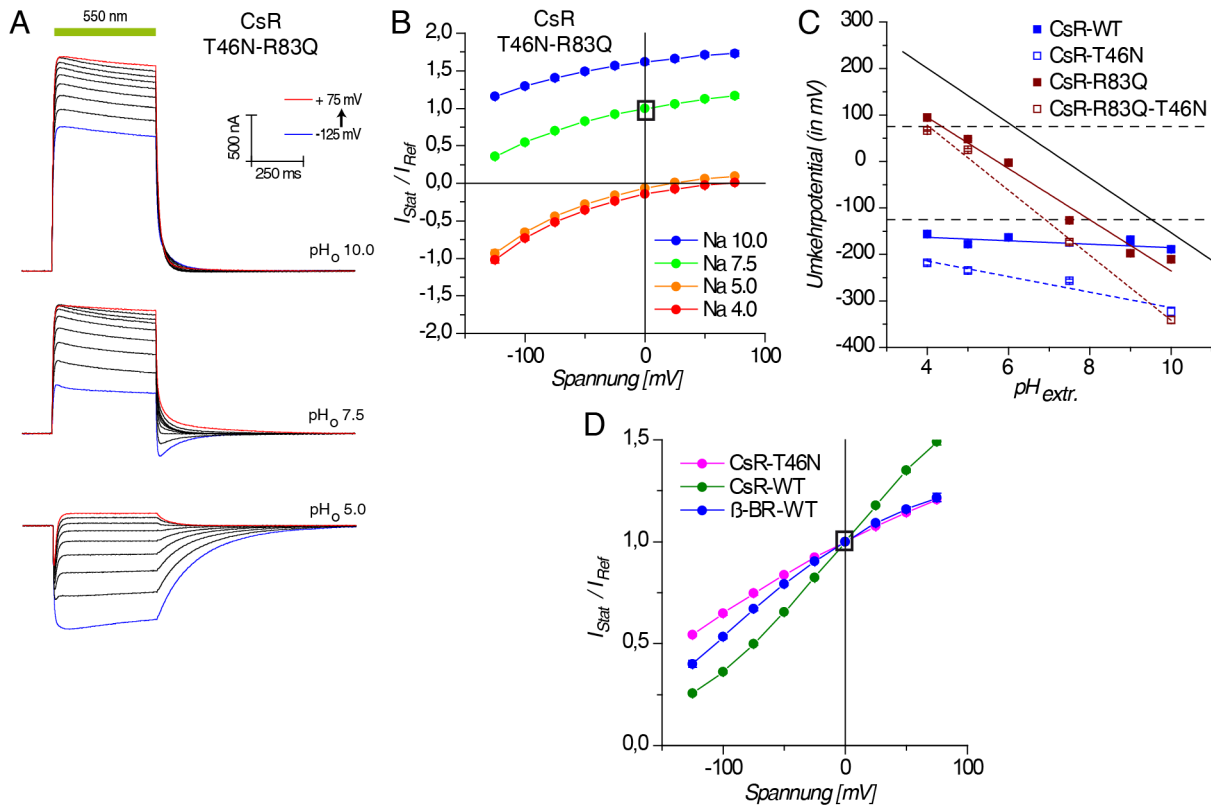


Abbildung 41: Kombination der R83Q-Mutante mit der intrazellulären T46N-Mutation. A-B: Repräsentative Stromspuren und Strom-Spannungsabhängigkeit. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n=[4/5/4/5]$. C: Vergleich der Umkehrpotentiale der verschiedenen CsR-Varianten. Die Daten für CsR-WT und CsR-R83Q wurden aus Abbildung 39 übernommen. Im Gegensatz zu den vorherigen Diagrammen wurden die Umkehrpotentiale zur Übersichtlichkeit linear gefittet. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{T46N}=[4/8/4/4]$ und $n_{T46N-R83Q}=[4/5/5/2]$. D: Vergleich der Strom-Spannungsabhängigkeit von CsR-WT ($n=34$), β-BR ($n=17$) und CsR-T46N ($n=9$). Alle drei wurden jeweils unter identischen Bedingungen (550 nm, 500 ms, $pH_o=7.5$) gemessen und auf 0 mV normalisiert, um die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit direkt zeigen zu können. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Zuletzt seien zwei besonders interessante Doppelmutanten gezeigt. Hierbei wurde CsR-R83Q mit den Mutationen M119T und W182F getestet. Diese beiden Mutationen an der Retinal-Bindetasche waren durch ein langlebiges blaues Intermediat gekennzeichnet, wodurch auch die absoluten stationären Ströme reduziert waren (Abbildung 38). Interessanterweise führt die Kombination dieser Mutanten mit R83Q zu einer drastischen Verlangsamung der *off*-Kinetik der einwärts gerichteten passiven Ströme, wie in Abbildung 42 gezeigt. Aufgrund der hohen negativen Photostromamplituden über 3000 nA bei negativen Haltespannungen ist davon auszugehen, dass pro Photozyklus deutlich mehr als nur ein Proton passiv transportiert werden. Der Effekt war bei CsR-R83Q-W182F besonders stark ausgeprägt, jedoch ließ sich CsR-R83Q-M119T aufgrund des zeitlich kürzeren Messprotokolls deutlich leichter analysieren. Die Analyse der Strom-Spannungsabhängigkeit und der daraus sich ergebenden Umkehrpotentiale zeigen (Abbildungen 42C und D), dass CsR-R83Q-M119T gegenüber CsR-R83Q positivere Umkehrpotentiale besitzt. Daher hat CsR-R83Q-M119T zusätzlich an Pumpkraft verloren

und zeigt verstärkt einen Kanalcharakter. Trotzdem ist nach wie vor eine Pumpaktivität bei allen pH_o -Bedingungen vorhanden.

Die entscheidende Erkenntnis aus den Doppelmutanten CsR-R83Q-M119T und CsR-R83Q-W182F ist, dass der Kanalcharakter von R83Q begünstigt wird, wenn ein Blaulicht empfindliches Intermediat aus dem Photozyklus langlebiger wird (wahrscheinlich das M-Intermediat). Diese Erkenntnis ist besonders für die Diskussion über ein geeignetes Photozyklus-Modell für den Pump-Kanal-Dualismus in Abschnitt 3.3.1 von Bedeutung.

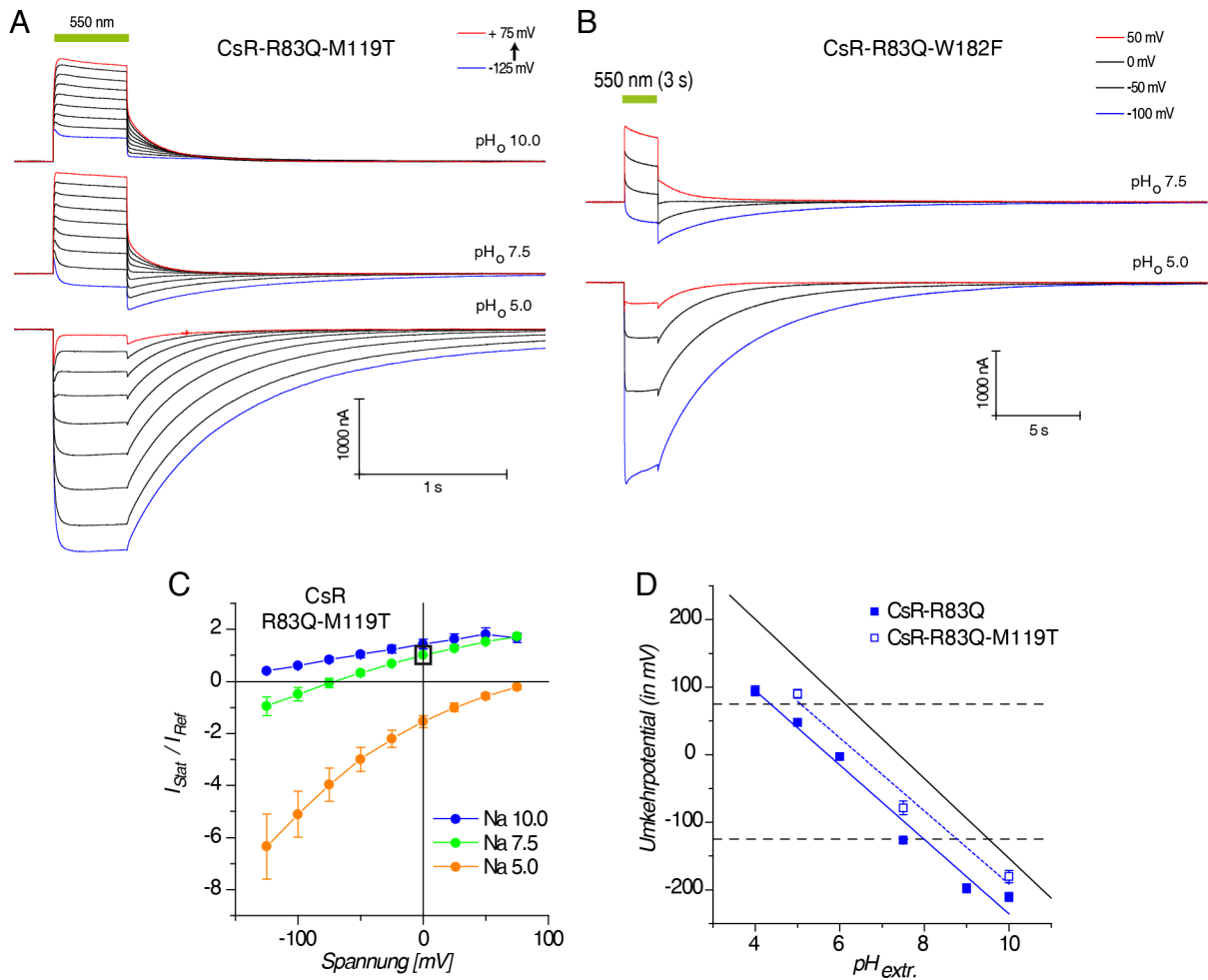


Abbildung 42: Mutationen der Retinal-Bindetasche in Kombination mit der R83Q-Mutante. A-B: Repräsentative Stromspuren der Doppelmutanten CsR-R83Q-M119T und CsR-R83Q-W182F. Aufgrund der sehr langsamen *off*-Kinetik von CsR-R83Q-W182F wurde hier das Standardprotokoll geändert. So wurde die stationäre Belichtung auf 3 s verlängert, die Spannungsschritte auf vier verkürzt und zwischen jeder Spannung wurden 300 s gewartet, um die „recovery“ in den Grundzustand zu gewährleisten. C: Strom-Spannungsabhängigkeit der Doppelmutante CsR-R83Q-M119T. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. pH_o =[10/7.5/5] mit n =[5/6/5]. D: Vergleich der Umkehrpotentiale. Die Daten für CsR-R83Q wurden aus Abbildung 39 übernommen. Die Umkehrpotentiale wurden linear gefittet. Die schwarze Linie kennzeichnet die theoretischen Umkehrpotentiale eines passiven Protonenkanals. pH_o =[10/7.5/5] mit n_{RQ-MT} =[5/6/4]. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

2.4 Sind die CsR-Mutationen auf andere Protonenpumpen übertragbar?

Die Analyse der Positionen in CsR hat neue Erkenntnisse zu den wichtigsten Elementen für die Aufrechterhaltung und Modulierung der Pumpaktivität geliefert. Andererseits wurden auch Unterschiede zwischen CsR und BR entdeckt. Um die Erkenntnisse von CsR tatsächlich auf alle Protonenpumpen übertragen zu können, wurden einige Mutationen in den Protonenpumpen BR, GR und Mac getestet. Im Folgenden werden die Ergebnisse kurz vorgestellt.

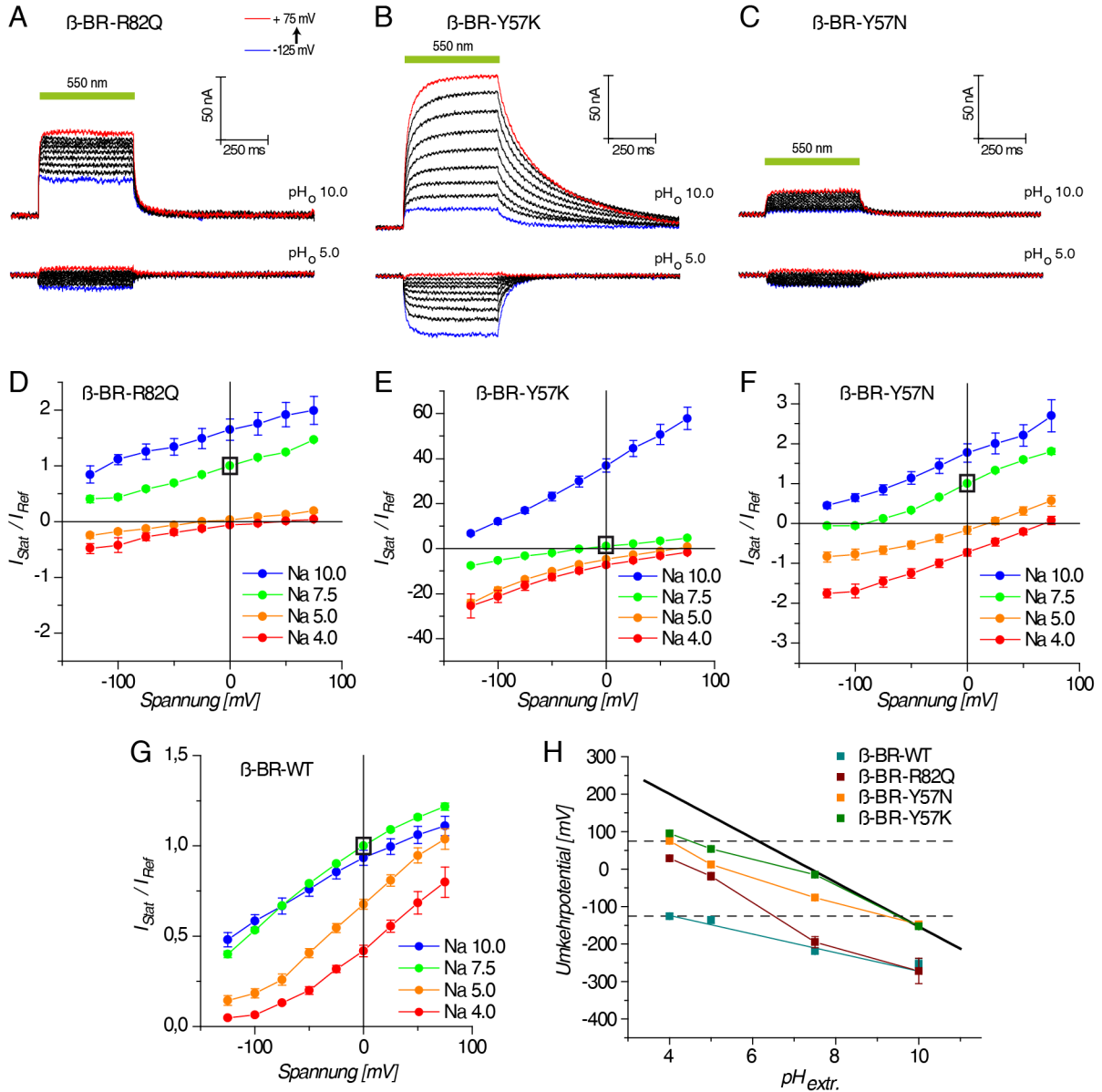


Abbildung 43: Untersuchung der Positionen R82 und Y57 in β -BR. A-C: Repräsentative Stromspuren der Mutanten. D-G: Strom-Spannungskurven der stationären Ströme im Vergleich zu β -BR-WT. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. Die Anzahl der Einzelmessungen ist identisch zu den Angaben bei den Umkehrpotentialen. H: Vergleich der Umkehrpotentiale. Die Werte vom WT sind linear gefittet, während Punkte für die Mutante ohne Fit verbunden wurden. pH_o =[10/7.5/5/4] mit n_{R82Q} =[5/8/4/3], n_{Y57K} =[6/6/5/3], n_{Y57N} =[8/11/8/6] und n_{WT} =[8/17/10/7]. Alle Daten sind als mean \pm SE angegeben.

Zuerst wurden die Mutationen R82Q, Y57K und Y57N in β -BR getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 43 zeigen, dass BR-R82Q ebenfalls einwärts gerichtete Photoströme bei hohen elektrochemischen Gradienten zeigt. Diese sind jedoch nur sehr schwach und quantitativ und qualitativ verschieden zu CsR-R83Q. Im Gegensatz dazu verhält sich BR-Y57K analog zu CsR-Y57K.

Interessanterweise ist BR-Y57N trotz niedriger Stromamplituden funktional und zeigt einwärts gerichtete Ströme. CsR-Y57N zeigte keinerlei Funktionalität.

Bei der ursprünglichen Untersuchung des *Gloeobacter*-Rhodopsins in Abschnitt 2.2 standen die Positionen GR-R118 und GR-Y88 (\triangle BR-R82Q und -Y57K) nicht im Fokus, weil diese Positionen sowohl in Pumpen vom BR-Typ als auch im PR-Typ konserviert sind. Motiviert durch die Ergebnisse bei CsR wurden diese Positionen nachträglich auch in GR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 zusammengefasst. GR-R118Q zeigt im Gegensatz zu GR-WT (Abbildung 21) kaum einwärts gerichtete Photoströme. Trotzdem ist die Pumpkraft von GR-R118Q schwächer als bei GR-WT, wie beim Vergleich der Umkehrpotentiale in Abbildung 44H zu sehen ist.

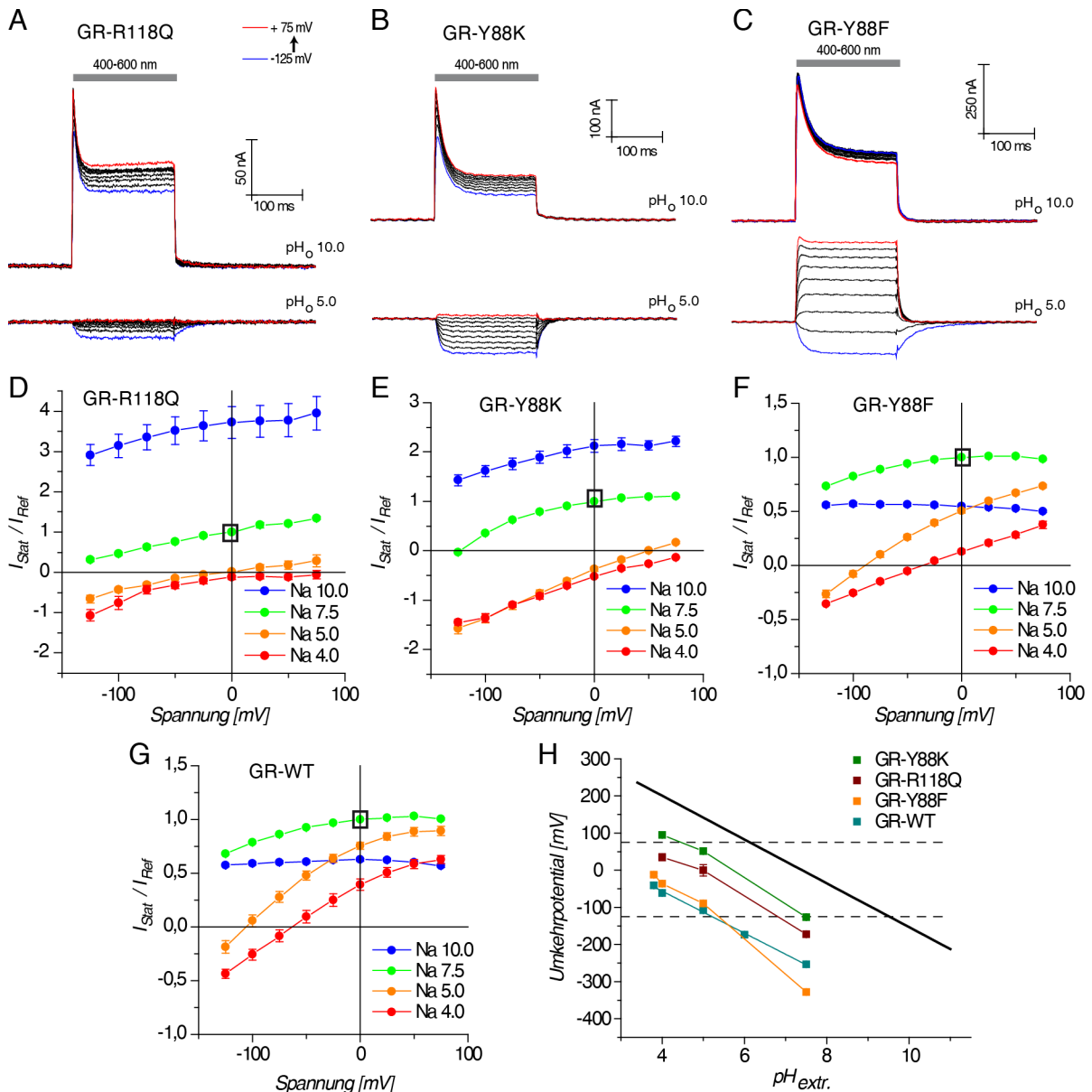


Abbildung 44: Untersuchung der Positionen R118 und Y88 in GR (\triangle BR-R82 und Y57). Es wurden stets die stationären Ströme bei 400-600 nm und 200 ms Belichtung ausgewertet. A-C: Repräsentative Stromspalten. D-G: Strom-Spannungskurven der Mutanten und von GR-WT. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. $pH_o=[10/7.5/5/4]$ mit $n_{R118Q}=[6/9/6/5]$, $n_{Y88K}=[4/5/5/5]$, $n_{Y88F}=[5/6/5/4]$ und $n_{WT}=[9/26/8/6-10]$. H: Vergleich der Umkehrpotentiale. Die Werte vom WT sind linear gefittet, während Punkte für die Mutante ohne Fit verbunden wurden. $pH_o=[7.5/6/5/4/3.8]$ mit $n_{R118Q}=[9/0/6/5/0]$, $n_{Y88K}=[5/0/5/5/0]$, $n_{Y88F}=[6/0/5/4/3]$ und $n_{WT}=[23/6/9/10/3]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

2.4 Sind die CsR-Mutationen auf andere Protonenpumpen übertragbar?

Die Mutante GR-Y88K zeigt sowohl auswärts als auch einwärts gerichtete Photoströme (Abbildungen 44B und E). Im Gegensatz zu BR-Y57K und CsR-Y57K sind die auswärts gerichteten Photoströme nicht überproportional groß und zeigen einen transienten Strom. Bei Betrachtung der Umkehrpotentiale fällt besonders auf, dass die Pumpkraft von GR-Y88K gegenüber GR-WT deutlich reduziert ist (Abbildung 44H). Zudem ist, ebenfalls im Gegensatz zu BR-Y57K und CsR-Y57K, im pH_o -Bereich von 6.0 bis 10.0 eine residuale Pumpaktivität zu beobachten. Die Mutante GR-Y88F hatte keine relevanten Änderungen in den Photoströmen gegenüber GR-WT verursacht, ähnlich wie bei CsR-Y57F (Abschnitt 2.3.4).

Bei der Protonenpumpe Mac (BR-Typ) wurde nur die Mutante R136Q (\triangle BR-R82Q) getestet, jedoch zeigte diese ein sehr interessantes Verhalten. Die Mutante Mac-R136Q ist funktional und zeigt einwärts gerichtete Photoströme, wie in Abbildung 45 zu sehen ist. Bei der Betrachtung der Strom-Spannungskurven und der Umkehrpotentiale fällt auf, dass sich diese CsR-Y57K ähneln. Im Gegensatz zu CsR-Y57K ist jedoch eine residuale Pumpaktivität wie bei CsR-R83Q zu sehen. Es lässt sich schlussfolgern, dass Mac-R136Q sowohl Eigenschaften von CsR-Y57K also auch von CsR-R83Q in sich vereint.

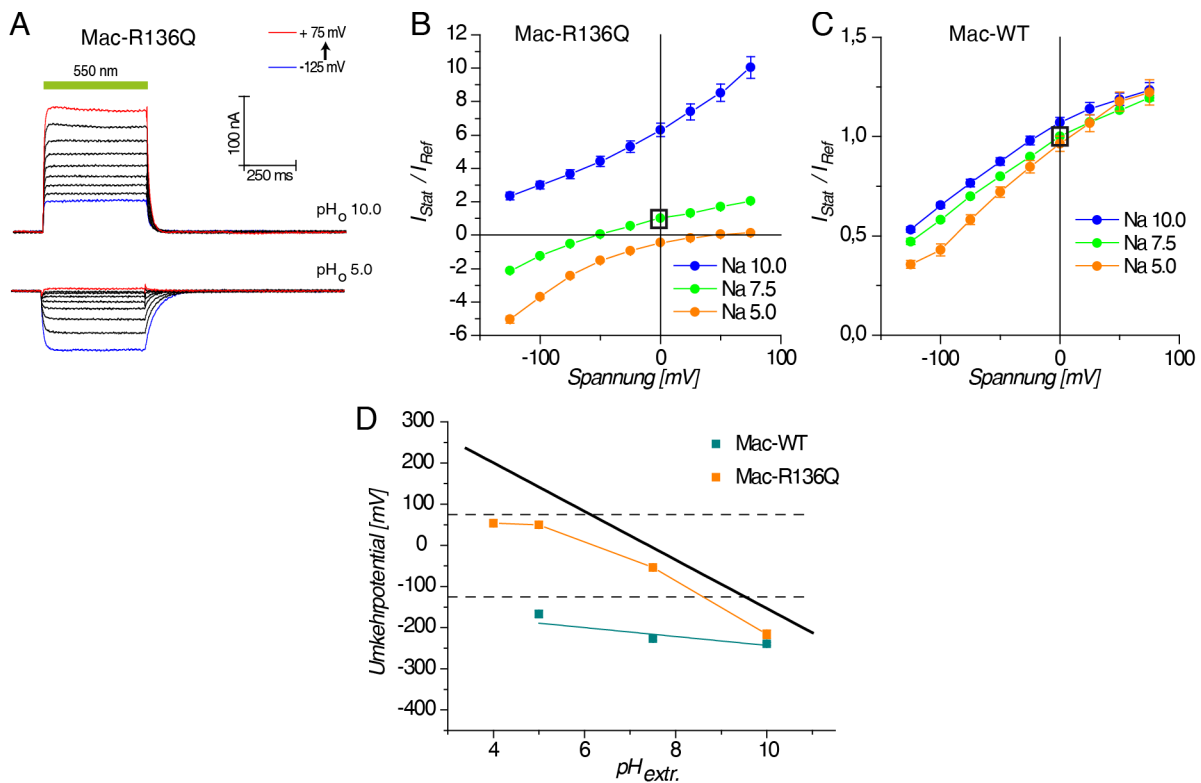


Abbildung 45: Untersuchung der Mutante Mac-R136Q (\triangle BR-R82). Es wurden stets die stationären Ströme bei 550 nm und 500 ms Belichtung ausgewertet. A: Repräsentative Stromspuren. B-C: Strom-Spannungskurven von Mac-WT und Mac-R136Q. Die jeweilige Referenz-Bedingung für die Normalisierung ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet. Die Anzahl der Einzelmessungen ist identisch zu den Angaben bei den Umkehrpotentialen. C: Vergleich der Umkehrpotentiale. Die Werte vom WT sind linear gefittet, während Punkte für die Mutante ohne Fit verbunden wurden. $pH_o = [10/7.5/5/4]$ mit $n_{R136Q} = [5/5/5/3]$ und $n_{WT} = [8/14/10/0]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Die Übertragung der Mutationen CsR-R83Q und CsR-Y57K auf andere Protonenpumpen hat gezeigt, dass diese Mutationen in allen getesteten Protonenpumpen ebenfalls zu einer Reduzierung der Pumpkraft führen. Somit spielen diese Positionen grundsätzlich in allen Protonenpumpen eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Pumpkraft. Die Amplituden der einwärts gerichteten Photoströme und die Umkehrpotentiale unterschieden sich jedoch teils deutlich.

2.5 Kanalrhodopsine mit negativ verschobenen Umkehrpotentialen

Die Untersuchungen an den Pumpen haben gezeigt, dass offenbar ein Dualismus von Kanalaktivität und Pumpaktivität auftreten kann. Während dieser Doktorarbeit wurden zwei Fälle von Kanalrhodopsin-Mutanten untersucht, welche ein negativ verschobenes Umkehrpotential im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp zeigten. Dies war ein Indiz für Pumpströme und war daher von hohem Interesse. Untersuchungen mit Chr2 an „giant-HEK293-cells“ deuteten bereits darauf hin, dass so ein Dualismus auch bei den Kanalrhodopsinen existiert, jedoch in nur sehr schwach ausgeprägter Form [123].

2.5.1 Ein Kanalrhodopsin mit Pumpströmen: ChR1-T198M

Die bisher nicht publizierte Mutante ChR1-T198M (\triangle ChR2-T159 bzw. BR-M118) ist ein Kandidat für ein Kanalrhodopsin mit ausgeprägter Pumpaktivität. Diese Mutante wurde ursprünglich von Dr. Satoshi Tsunoda entdeckt und er erkannte auch bereits, dass diese Mutante sowohl Kanalaktivität als auch H^+ -Pumpaktivität zeigen könnte. Erst die Arbeiten von Dr. Satoshi Tsunoda führten dazu, dass die wichtige ChR2-T159C Mutation entdeckt wurde, welche eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Optogenetik mit Kanalrhodopsinen war [95]. Leider wurden die Eigenschaften von ChR1-T198M damals aus verschiedenen Gründen nicht intensiver untersucht. Daher wurde diese Mutante im Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit und mit dem Einverständnis von Dr. Satoshi Tsunoda erneut gemessen.

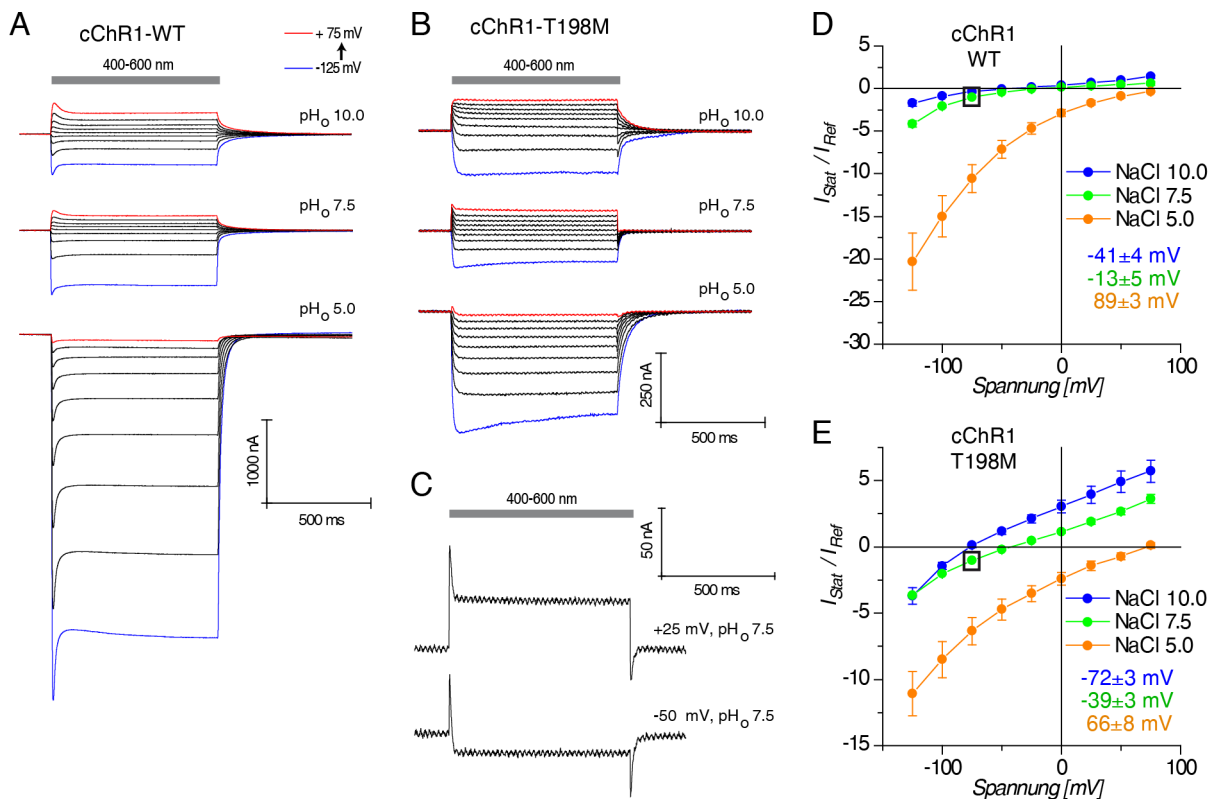


Abbildung 46: Untersuchung der Photoströme von cChR1-WT und cChR1-T198M. Die Oozyten wurden mit 400-600 nm für 800 ms in Gegenwart von 100 mM NaCl belichtet. A-B: Exemplarische Stromkurven. C: Vergrößerte Darstellung der Photoströme von cChR1-T198M bei -50 mV und +25 mV. D-E: Strom-Spannungskurven. Die Ströme sind auf 100 mM NaCl und pH_o=7.5 bei -75 mV normiert (schwarze Kästchen). Zusätzlich sind die jeweiligen Umkehrpotentiale E_{rev} gezeigt. pH_o=[10.0/7.5/5.0] mit n_{WT} =[5/5/4] und n_{T198M} =[9/24-25/9]. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Alle hier gezeigten Experimente zu ChR1 wurden mit der verkürzten cChR1₁₋₃₄₆-Variante durchgeführt („codon-usage“ von *Chlamydomonas reinhardtii*, Aminosäuren 1-346, ohne Myc-tag). Die Belichtung erfolgte mit dem 400-600 nm Filter, weil das Spektrum von ChR1 pH_o -abhängig ist [71, 144].

Typische Stromspuren und die Strom-Spannungs-Plots von ChR1-T198M im Vergleich zum WT sind in Abbildung 46 bei verschiedenen Spannungen und extrazellulären pH-Werten gezeigt. Die gezeigten Messungen zu ChR1-WT stimmen mit den publizierten Daten überein [71]. Dagegen zeigt cChR1-T198M folgende wichtige Unterschiede:

1. Am auffälligsten an der Mutante sind die initialen positiven Peak-Ströme bei Belichtung und die negativen Peak-Ströme unmittelbar nach der Belichtung (Abbildung 46C). Diese Eigenschaft ist am besten im Bereich vom Umkehrpotential sichtbar.
2. Die Umkehrpotentiale sind circa 23-31 mV negativer als beim WT. Das Umkehrpotential selbst ist wie beim WT unmittelbar vom extrazellulären pH-Wert abhängig, jedoch ist die Differenz zwischen WT und Mutante nur gering vom pH_o -Wert abhängig.
3. Die Strom-Spannungskurven sind im Bereich von -75 mV bis +75 mV proportional zu der Spannung, weswegen auch keine „inward-rectification“ erkennbar ist. Erst bei hohen negativen Spannungen ist eine „inward-rectification“ erkennbar.
4. Die Photostrom-Amplituden sind generell kleiner als beim WT.

In den Vorarbeiten von Dr. Satoshi Tsunoda wurden nur die positiven Peak-Ströme als potentielle Pumpströme untersucht. Die negativen Verschiebungen der Umkehrpotentiale der stationären Ströme von cChR1-T198M im Vergleich zum WT sind ein Indiz, dass die stationären Ströme selbst eine Pumpaktivität enthalten. Deswegen konzentrieren sich die nachfolgenden Untersuchungen in Abbildung 47 auf die Umkehrpotentiale der stationären Ströme.

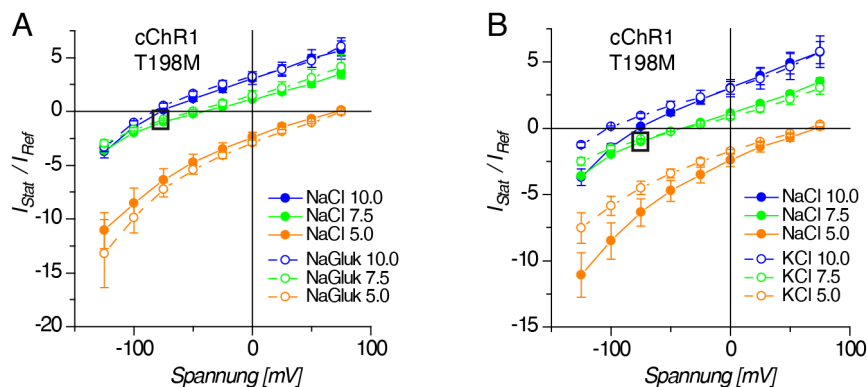


Abbildung 47: Erweiterte Auswertung der stationären Photoströme von ChR1-T198M. A: Untersuchung auf eine potentielle Chlorid-Leitfähigkeit durch Austausch von 100 mM NaCl mit 100 mM Na-Glukonat. B: Untersuchung der Kationenselektivität durch Austausch von 100 mM NaCl gegen 100 mM KCl. pH_o =[5.0/7.5/10] mit n_{NaCl} =[9/28/9], $n_{NaGlukonat}$ =[4/7/3] und n_{KCl} =[4/4/4]. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Grundsätzlich lässt sich eine negative Verschiebung der Umkehrpotentiale durch mehrere Ursachen erklären, welche im Folgenden einzeln untersucht wurden:

- 1) Theoretisch wäre die Verschiebung der Umkehrpotentiale zwischen WT und T198M durch eine Chlorid-Leitfähigkeit erklärbar. Diese wurde mit Hilfe von Na-Glukonat getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 47A zeigen eindeutig, dass Chlorid keine Rolle für die Effekte von ChR1-T198M spielt.
- 2) Eine weitere Erklärung wäre eine erhöhte Selektivität zwischen den Alkalimetallen zu Gunsten von Kalium. Daher wurde auch der extrazelluläre Pufferaustausch von 100 mM NaCl mit 100 mM KCl untersucht. Falls eine erhöhte Selektivität für Kalium bei cChR1-T198M vorliegt, dann sollte dieser Austausch zu einer positiven Verschiebung der Umkehrpotentiale führen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47B gezeigt, welche in der Tat Unterschiede bei $pH_o=10.0$ und $pH_o=5.0$ zeigen, jedoch sind die Umkehrpotentiale in Gegenwart von Kalium nicht positiv verschoben. Die Ergebnisse deuten eher auf eine leicht erhöhte Selektivität für Natrium hin, besonders bei alkalischen Bedingungen. Daher kann auch eine erhöhte Selektivität für Kalium als Ursache ausgeschlossen werden.
- 3) Allgemein wäre eine negative Verschiebung der Umkehrpotentiale auch durch eine starke Reduktion der Protonen-Leitfähigkeit gegenüber der Na^+ -Leitfähigkeit erklärbar. Diese Erklärung ist nur gültig, wenn davon ausgegangen wird, dass die Selektivität zwischen Na^+ und K^+ vernachlässigbar ist. Die Experimente aus Abbildung 47B zeigten, dass die Selektivität zwischen Na^+ und K^+ tatsächlich vernachlässigbar ist (zumindest gesichert bei $pH_o=7.5$). Die Formel hierfür wäre demnach:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{P_{Na+K} \times [Na^+ + K^+]_o + P_H \times [H^+]_o}{P_{Na+K} \times [Na^+ + K^+]_{in} + P_H \times [H^+]_{in}}$$

Die intrazelluläre Konzentration von Na^+ zusammen mit K^+ liegt in Oozyten bei circa 150 mM [145], während die extrazelluläre Konzentration im Experiment 100 mM betrug. Dadurch existiert ein auswärts gerichteter Gradient, welcher dem Protonengradienten, zumindest bei $pH_o=5.0$, entgegengesetzt ist. Daher ist diese Erklärung nur für $pH_o=5.0$ anwendbar.

Bei $pH_o=7.5$ liegt praktisch kein Protonengradient in Oozyten mehr vor. Der Gradient der Alkali-Ionen von 100 mM (extrazellulär) zu 150 mM (intrazellulär) reicht letztendlich nicht aus, um das experimentell bestimmte Umkehrpotential von -39 ± 3 mV bei $pH_o=7.5$ zu erzeugen (Abbildung 46E):

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{P_{Na+K} \times [100 \text{ mM}]_o}{P_{Na+K} \times [150 \text{ mM}]_{in}} = -10,4 \text{ mV} \neq -39 \text{ mV} \quad (\text{bei } 25^\circ\text{C}, pH_o \approx pH_{in})$$

Wie erwartet stimmt dagegen der berechnete Wert von $E_{rev} = -10,4$ mV perfekt mit dem experimentellen Wert für ChR1-WT von $E_{rev} = 13 \pm 5$ mV überein. Aus diesen Überlegungen kommt die Erklärung einer erhöhten Na^+ -Leitfähigkeit als Hauptgrund für die Unterschiede zwischen ChR1-WT und ChR1-T198M theoretisch nicht mehr in Frage.

Zur experimentellen Kontrolle wurde trotzdem NaCl im extrazellulären Puffer mit 100 mM NMG-Cl bei verschiedenen pH_o-Bedingungen ausgetauscht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 gezeigt. Bei ChR1-WT sind bei pH_o 5.0 und pH_o 7.5 keine Unterschiede beim Austausch von Na⁺ mit NMG⁺ erkennbar, zumindest im Bereich vom Umkehrpotential (Abbildungen 48A und B). Erst bei pH_o=10 wurde ein ΔE_{rev} von 50 mV zwischen Na⁺ und NMG⁺ beim ChR1-WT gemessen (Abbildung 48C). Dies wurde erwartet, weil der einwärts gerichtete Protonentransport durch die sehr hohe Protonen-Leitfähigkeit um den Faktor 10⁶ gegenüber Na⁺ massiv dominierte [144].

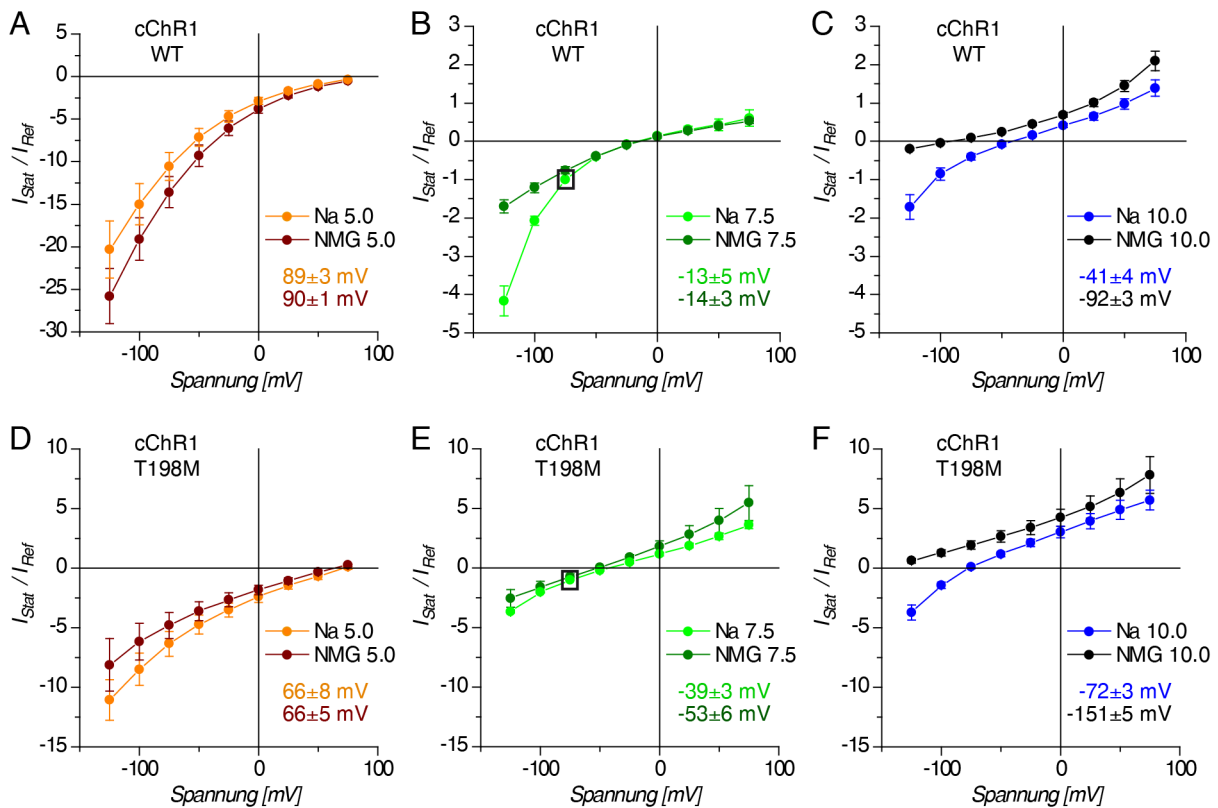


Abbildung 48: Untersuchung der Na⁺-Selektivität von ChR1-T198M im Vergleich zum WT. Die Oozyten wurden mit dem 400-600 nm Filter bei den extrazellulären pH-Werten 10.0, 7.5 und 5.0 in Gegenwart von 100 mM NaCl oder 100 mM NMG-Cl belichtet. Es wurden nur die stationären Ströme ausgewertet. Die Normierung erfolgte bei pH_o=7.5 mit 100 mM NaCl und bei -75 mV (schwarze Kästchen). Zusätzlich sind die jeweiligen Umkehrpotentiale E_{rev} gezeigt. pH_o=[5.0/7.5/10], WT: NaCl n=[4/5/5] und für NMG n=[3/3/3], T198M: NaCl n=[9/24-25/9] und für NMG n=[4/9/3]. Alle Daten sind als mean±SE angegeben.

Die Mutante ChR1-T198M zeigt ebenfalls bei pH_o=5.0 keine Unterschiede zwischen Na⁺ und NMG⁺ (Abbildung 48D). Dies ist noch kein endgültiger experimenteller Beweis, dass damit bereits eine erhöhte Na⁺-Leitfähigkeit ausgeschlossen werden kann. Eine Reduktion der Protonenleitfähigkeit von Faktor 10⁶ auf 10⁵ gegenüber Na⁺ reicht aus, um die Verschiebung von 23 mV im Vergleich zum WT zu erklären. In dem Fall würde die Verschiebung des Umkehrpotentials beim Austausch von Na⁺ mit NMG⁺ bei pH_o=5.0 nur im Bereich von circa 5 mV liegen und wäre somit innerhalb der Fehlergrenzen der hier gezeigten Messungen.

Bei pH_o=7.5 lässt sich, wie bereits geschildert, die Verschiebung von E_{rev} der Mutante im Vergleich zum WT grundsätzlich nicht mehr durch eine Veränderung der Leitfähigkeiten zwischen Na⁺ und H⁺ erklären. Trotzdem zeigt die Mutante eine Differenz der Umkehrpotentiale von ΔE_{rev}=14±9 mV (beim WT ΔE_{rev}=1±8 mV) zwischen 100 mM Na⁺ und 100 mM NMG⁺ (Abbildung 48E). Bei pH_o=10 ist diese Differenz mit 79±8 mV (beim WT

$\Delta E_{rev}=51\pm7$ mV) noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 48F). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ChR1-T198M tatsächlich eine erhöhte Na^+ -Leitfähigkeit im Vergleich zum WT besitzt. Hiermit werden die Ergebnisse aus dem Austausch von Natrium gegen Kalium bestätigt (siehe Stichpunkt 2), welche ebenfalls eine erhöhte Natrium-Selektivität andeuteten.

Die Eigenschaft der erhöhten Na^+ -Leitfähigkeit von ChR1-T198M reicht letztendlich nicht aus, um die Unterschiede in den Umkehrpotentialen gegenüber dem WT zu erklären (zumindest bei $\text{pH}_o=7.5$ und $\text{pH}_o=10.0$).

- 4) Eine alternative Erklärung für die Eigenschaften von ChR1-T198M ist ein Dualismus aus einem Kanalstrom und einem Pumpstrom. Experimentell wäre dies durch Variation des intrazellulären Puffers direkt nachweisbar. Leider sind die Photoströme von ChR1 in HEK-Zellen sehr schwach, weswegen ChR1-T198M bisher nicht unter kontrollierten intrazellulären Pufferbedingungen getestet werden konnte.

Da die Punkte 1) bis 3) nicht als Erklärung für die Beobachtungen bei $\text{pH}_o=7.5$ und $\text{pH}_o=10.0$ geeignet sind, ist die wahrscheinlichste Interpretation folgende: ChR1-T198M zeigt neben einer Kanalaktivität auch eine Pumpaktivität.

2.5.2 Gating-Mutanten von ChR2

Die erste Strukturaufklärung eines Kanalrhodopsins, die Chimäre C1C2 [76], bot erstmals die Möglichkeit sehr zielgerichtet Schlüsselpositionen in einem Kanalrhodopsin zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit Kollegen wurden daher potentiell interessante Mutanten in ChR2 ausgewählt und in Oozyten (hier gezeigte eigene Messungen) und HEK-Zellen (Kollegen) getestet. Besonders die Mutante ChR2-E90K war von Interesse, weil diese ein negativ verschobenes Umkehrpotential gegenüber ChR2-WT aufwies. Dies war ein Hinweis für eine Änderung der Ionenselektivität oder für die Existenz einer Pumpaktivität. Im Folgenden werden die wichtigsten Mutanten kurz vorgestellt und anschließend die Mutante ChR2-E90K intensiver betrachtet.

Die hier gezeigten Mutanten an den Positionen N258, S63 und E90 werden dem so genannten „*central-gate*“ in Kanalrhodopsinen zugeordnet. Diese Positionen liegen in räumlicher Nähe zu den „*leak*-Mutanten“ in den Pumpen aus den vorherigen Abschnitten, weswegen diese Mutationen auch direkt für die Pumpen relevant sind. Diese Mutanten wurden teils schon früher von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht und publiziert [76, 146, 147], jedoch wurde es als sinnvoll erachtet diese Positionen intensiver zu untersuchen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für alle nachfolgenden Experimente eine humanisierte ChR2-Variante mit den Aminosäuren 1-309 und dem C-terminalen Fluorophor mCherry verwendet, da Abbildung 17 darauf hindeutete, dass die Länge der Kanalrhodopsine einen Einfluss auf die Photoströme haben kann.

Abbildung 49 zeigt typische Stromspuren der getesteten Mutanten bei $\text{pH}_o=7.5$ im Standardpuffer mit 100 mM NaCl. Alle Mutanten hatten zusätzlich die T159C-Mutation, welche zu größeren Stromamplituden führt. Als Kontrolle wurden auch hChR2-WT mit hChR2-T159C verglichen, weil das hier verwendete Konstrukt mit mCherry zum ersten Mal in Oozyten getestet wurde.

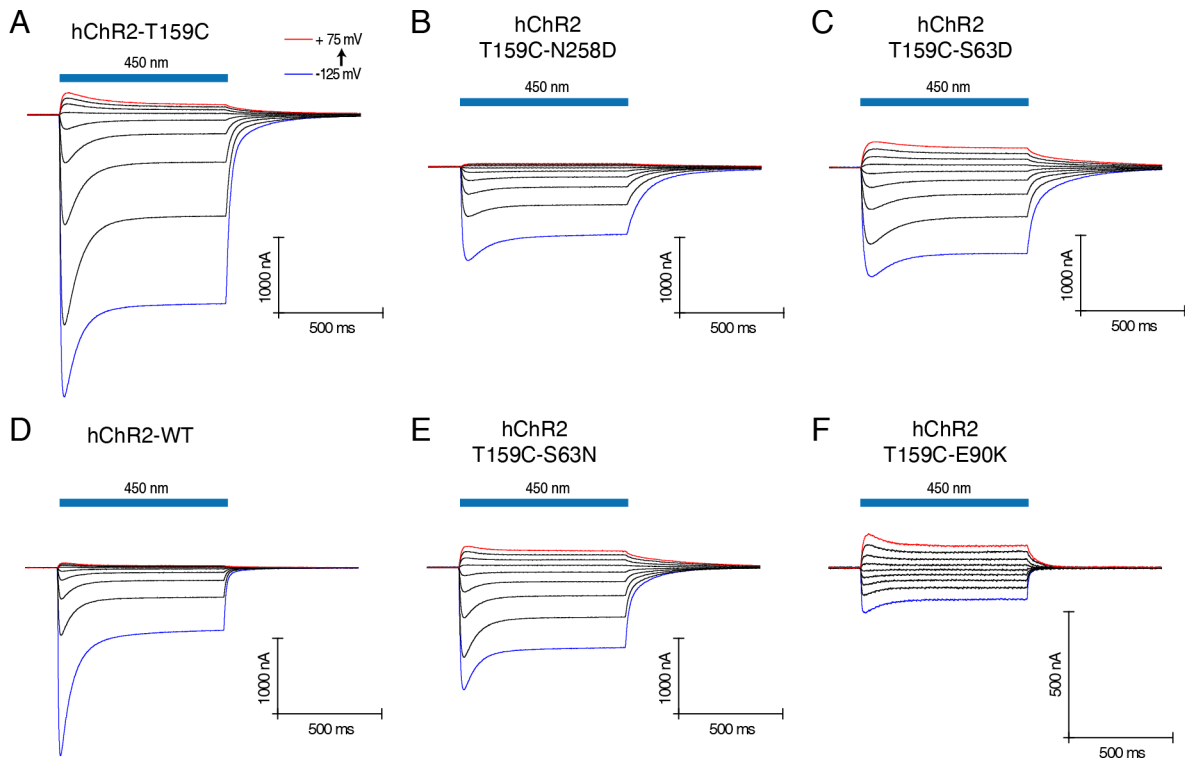


Abbildung 49: Exemplarische Stromspuren verschiedener hChR2-Mutanten. Alle gezeigten Varianten basieren auf humanisiertem ChR2 mit den Aminosäuren 1-309 sowie mCherry ohne Myc-tag, welches über einen Linker an den C-Terminus vom ChR2 angehängt wurde. Die Oozyten wurden mit dem 450 nm-Filter (Transmissionsspektrum in Abbildung 74) bei $pH_o=7.5$ und 100 mM NaCl für 800 ms belichtet.

Wie in früheren Arbeiten an anderen ChR2-Varianten bereits gezeigt, bewirkt die Mutation T159C im Vergleich zum WT schwächere transiente Peak-Ströme im Verhältnis zu den stationären Strömen, langsamere Kinetiken und größere Stromamplituden [95]. In Abbildung 17 wurden die Amplituden von ChR2-WT und ChR2-T159C (im Folgenden als ChR2-TC abgekürzt) bereits zusammen mit anderen Kanalrhodopsin-Varianten und den Pumpen verglichen.

Die getesteten Mutanten N258D, S63D, S63N und E90K sind alle funktional (alle inklusive T159C). Das Verhältnis aus den transienten Peak-Strömen und den stationären Strömen ist vergleichbar zu ChR2-TC. Die Mutante N258D zeigt im Vergleich zu ChR2-TC leicht reduzierte auswärts gerichtete Ströme. S63D und S63N zeigen unter den gemessenen Bedingungen keine besonderen Auffälligkeiten. Die Mutante E90K unterscheidet sich am stärksten und zeigt generell kleinere Stromamplituden und eine negative Verschiebung des Umkehrpotentials ähnlich wie bei ChR1-T198M im vorherigen Abschnitt. Zudem sind die *off*-Kinetiken von E90K der einwärts gerichteten Ströme im Vergleich zu den auswärts gerichteten Strömen unterschiedlich. Allgemein sind die Unterschiede der Mutanten, außer bei E90K, gegenüber dem WT unerwartet klein.

Als nächstes wurden die Umkehrpotentiale der Mutanten bei verschiedenen pH_o -Werten untersucht, welche in Abbildung 50 gezeigt sind. Im Unterschied zu ChR1 (Abbildung 46) wurde lediglich im pH_o -Bereich von 6.0 bis 9.0 gemessen, weil die Ströme von ChR2-TC bei niedrigen pH_o -Werten sehr groß werden und die Stabilität der Haltespannung beeinflussen. Es konnten keine relevanten Unterschiede zwischen ChR2-TC und ChR2-WT festgestellt werden.

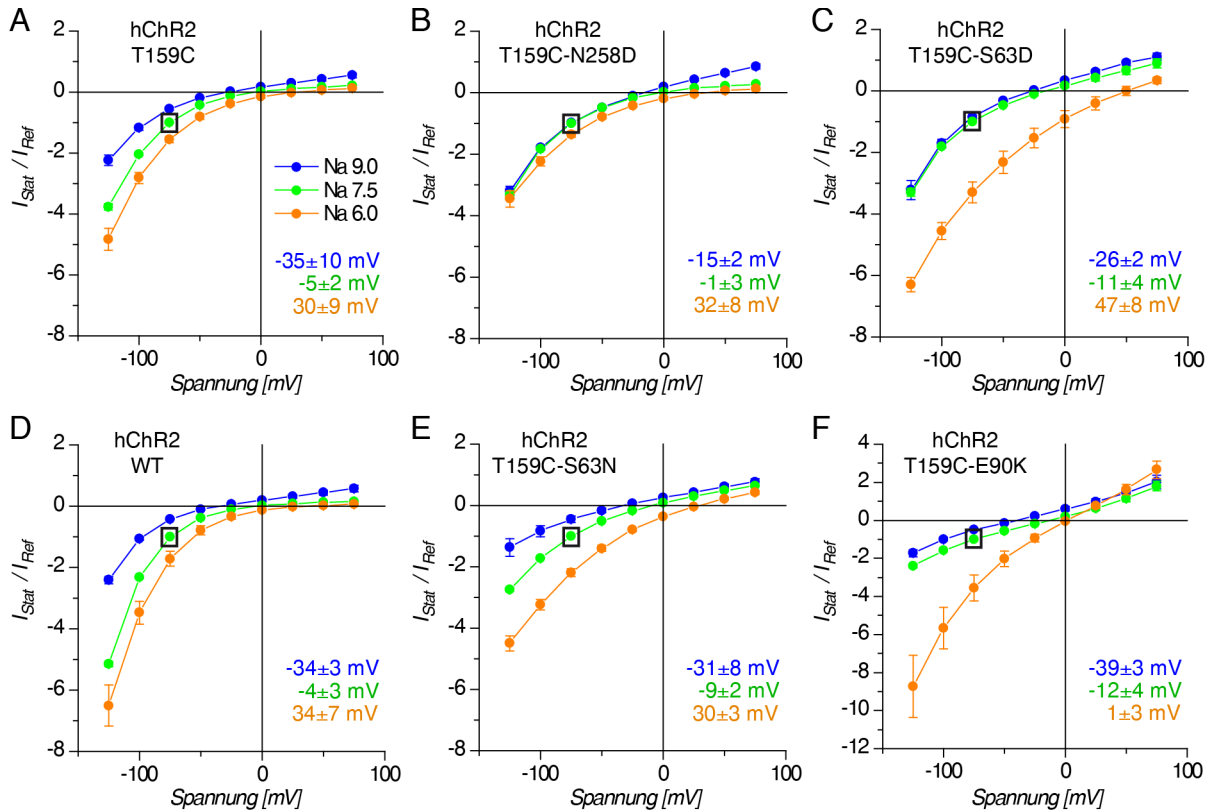


Abbildung 50: Auswertung der stationären Photoströme der ChR2-Mutanten. Die Oozyten wurden mit dem 450 nm Filter bei den extrazellulären pH-Werten 9.0, 7.5 und 6.0 in Gegenwart von 100 mM NaCl belichtet. Die Ströme sind auf 100 mM NaCl und $pH_o=7.5$ bei -75 mV normiert (schwarze Kästchen). Zusätzlich sind die jeweiligen Umkehrpotentiale E_{rev} gezeigt. $pH_o=[9/7.5/6]$, $n_{T159C}=[8/25/8]$, $n_{TC-N258D}=[7/10/7]$, $n_{TC-S63D}=[6/12/6]$, $n_{WT}=[3/6/3]$, $n_{TC-S63N}=[4/4/4]$, $TC-E90K$ $n_{TC-E90K}=[6/11/6]$. Alle Daten sind als $mean \pm SE$ angegeben.

Von allen gezeigten Mutanten in Abbildung 50 konnten bei ChR2-TC-S63N keine Unterschiede zu ChR2-TC in den Umkehrpotentialen festgestellt werden. N258D zeigt bei $pH_o=9.0$ gegenüber ChR2-TC eine positive Umkehrpotential-Verschiebung von 20 ± 12 mV. Dagegen ist bei ChR2-TC-S63D eine positive Umkehrpotential-Verschiebung nur bei $pH_o=6.0$ von 17 ± 17 mV zu beobachten (Abbildung 50C). Bei den anderen pH_o -Bedingungen sind keine Unterschiede beim Vergleich von N258D und S63D mit ChR2-TC erkennbar. Die Unterschiede bei S63D und N258D lassen sich durch eine bereits bekannte erhöhte Leitfähigkeit von divalenten Kationen erklären, welche pH_o -abhängig ist [76, 146]. Deswegen wurden N258D, S63D und S63N im Weiteren nicht intensiver untersucht.

ChR2-TC-E90K zeigte die deutlichsten Unterschiede zu ChR2-TC. Aus Abbildung 50F geht hervor, dass bei $pH_o=6.0$ das Umkehrpotential gegenüber ChR2-TC um 29 ± 12 mV negativ verschoben ist. Hierdurch sind die auswärts gerichteten Ströme dominanter. Bei $pH_o=7.5$ und 9.0 sind keine eindeutigen Unterschiede erkennbar. Die negative Umkehrpotentialverschiebung bei $pH_o=6.0$ kann durch eine zusätzliche Pumpaktivität, durch eine Chloridleitfähigkeit oder durch eine erhöhte Selektivität für K^+ erklärt werden (vergleichbar zu ChR1-T198M in Abschnitt 2.5.1).

In Zusammenarbeit mit den Kollegen konnte eine Chloridleitfähigkeit bei ChR2-TC-E90K als Ursache identifiziert werden. Es fanden sich keine Hinweise für eine Pumpaktivität. Die Ergebnisse aus den Oozyten-Messungen sind in Abbildung 51 zusammengefasst. Somit sind ChR2-TC-E90K und ChR1-T198M grundlegend verschieden.

2.5 Kanalrhodopsine mit negativ verschobenen Umkehrpotentialen

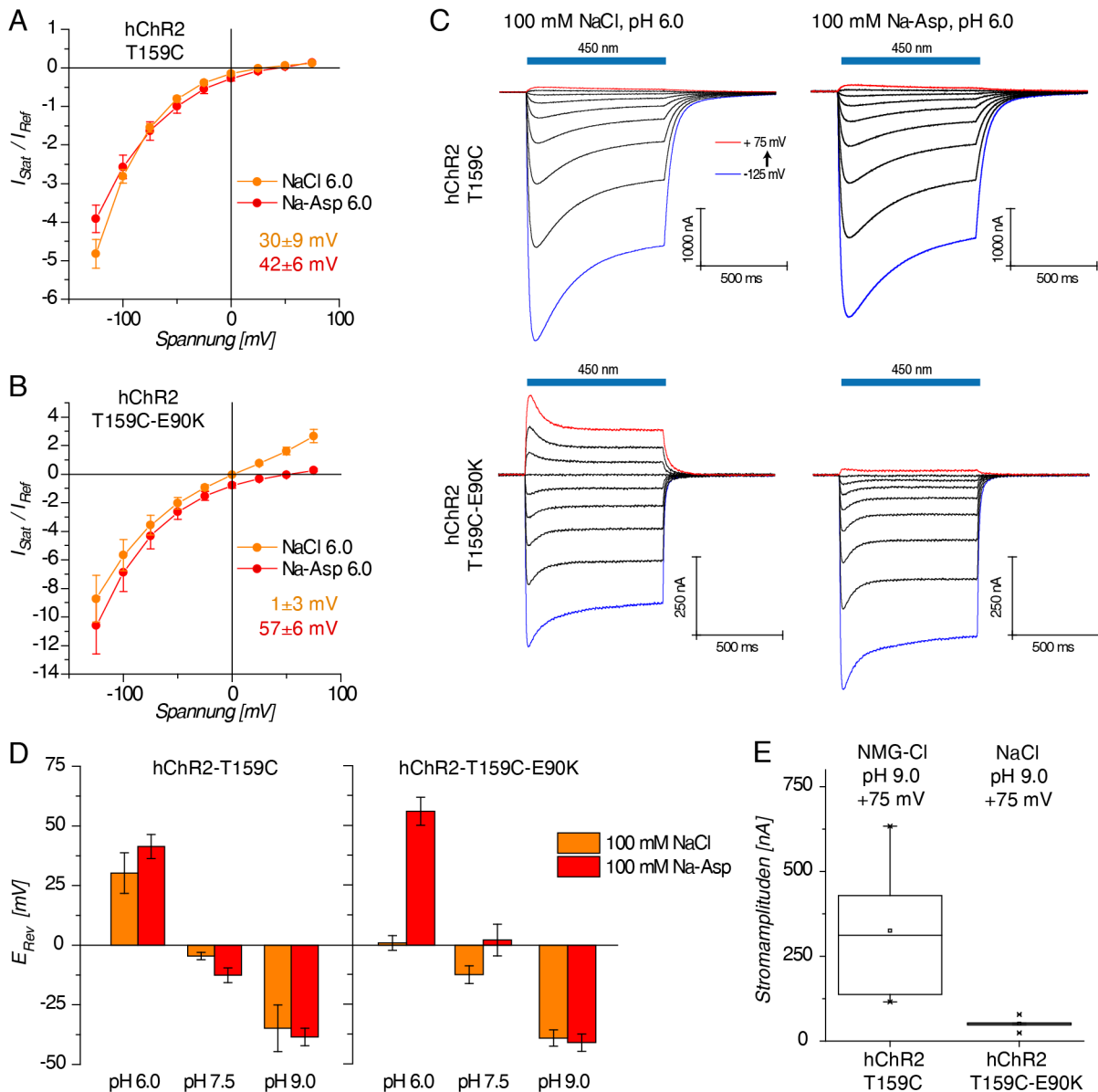


Abbildung 51: Detaillierte Untersuchung der Photoströme von ChR2-TC-E90K im Vergleich zu ChR2-TC. Die Oozyten wurden stets stationär unter Einsatz des 450 nm-Filters gemessen. A-B: Die Strom-Spannungskurven zeigen die Unterschiede beim Austausch von 100 mM NaCl gegen 100 mM Na-Aspartat. Diese sind bei $pH_o=6.0$ am stärksten ausgeprägt. Die Daten sind auf 100 mM NaCl und $pH_o=7.5$ normiert. C: Stromspuren beim Austausch von NaCl gegen Na-Aspartat. D: Umkehrpotentiale von T159C und TC-E90K im direkten Vergleich bei verschiedenen pH_o -Werten sowohl mit NaCl als auch Na-Aspartat. Alle Daten in A, B und D sind als $mean \pm SE$ angegeben. $pH_o=[6.0/7.5/9.0]$, T159C: NaCl $n=8/25/8$ und für Na-Aspartat $n=[6/6/6]$, TC-E90K: NaCl $n=[6/11/6]$ und für Na-Aspartat $n=[5/8/6]$. E: Box-Chart Diagramm der absoluten Stromamplituden. Gezeigt sind die Amplituden unter den jeweils besten Bedingungen für positive Photoströme. Es soll verdeutlicht werden, dass die absoluten Stromamplituden von TC-E90K generell klein sind. T159C [$n=5$, Oozyten aus 3 Fröschen], TC-E90K [$n=6$, 1 Frosch].

In den Abbildungen 51A und B sind die Strom-Spannungskurven von ChR2-TC und ChR2-TC-E90K bei $pH_o=6.0$ gezeigt, weil die Chloridleitfähigkeit bei diesen Bedingungen am stärksten ausgeprägt ist. Beim Austausch von 100 mM NaCl mit 100 mM Na-Aspartat zeigen sich die Unterschiede erst im Spannungsbereich ab -25 mV bis +75 mV (in Oozyten konnte kein Unterschied bei der Verwendung von 100 mM Aspartat oder 100 mM Glukonat festgestellt werden). Daraus ist ersichtlich, dass die Protonenleitfähigkeit wie auch beim WT weiterhin stark dominiert. Abbildung 51C zeigt die entsprechenden Stromspuren, wobei für ChR2-TC-E90K eine Messung mit besonders hohen absoluten Amplituden gewählt wurde.

In Abbildung 51D sind die Umkehrpotentiale nicht nur bei $\text{pH}_0=6.0$, sondern auch bei den anderen pH_0 -Werten gezeigt. Hier wird deutlich, dass die Chloridleitfähigkeit nur bei $\text{pH}_0=6.0$ gut zu sehen ist. Interessanterweise konnte für ChR2-TC selbst zumindest bei $\text{pH}_0=7.5$ ein kleiner Unterschied in den Umkehrpotentialen zwischen NaCl und Na-Aspartat festgestellt werden. Die Ursache hierfür ist unklar. Aufgrund des Messprinzips der TEVC-Technik können Spannungs-Fehler durch eventuelle „*liquid-junction*“-Potentiale ausgeschlossen werden (persönliche Mitteilung, Dr. H. R. Polder, npi electronic GmbH).

Es muss jedoch erwähnt werden, dass die absoluten auswärts gerichteten Stromamplituden von ChR2-TC-E90K im Vergleich zu ChR2-TC gering sind, wie in Abbildung 51E gezeigt. In Abbildung 51E wurden ChR2-TC-E90K und ChR2-TC unter Bedingungen gemessen, bei welchen jeweils die größten auswärts gerichteten Photoströme erwartet wurden. Entweder ist die Expression in Oozyten oder die allgemeine Leitfähigkeit für Ionen von ChR2-TC-E90K schlechter als die von ChR2-TC.

Die Ergebnisse zur Untersuchung des „*central-gate*“ mit E90K wurden in Wietek *et al.* [148] zusammengefasst. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für den Vergleich der Kanalrhodopsine mit den Pumpen wird kurz in der Diskussion im Abschnitt 3.2.2 thematisiert.

2.6 Untersuchung mikrobieller Rhodopsine mit Retinal Analoga

Retinal-Analoga sind von Interesse, weil diese die Möglichkeit zum „color-tuning“ von Rhodopsinen für verschiedene Anwendungen bieten (siehe Abschnitt 1.6.2). Das Hauptziel dieses Projektes war ein bathochromer Absorptions-Shift der Kanalrhodopsine, welcher durch ein verlängertes π -Elektronensystem erreicht werden sollte. Die Ergebnisse zu den Retinal-Analoga lieferten unerwartet Einblicke in die Unterschiede zwischen Pumpen und Kanälen. Deswegen sind die Ergebnisse zu diesem Projekt hier mit aufgeführt, obwohl die Untersuchung von Protonenpumpen mit einwärts gerichteten Photoströmen im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

2.6.1 Strukturen und Absorptionsspektren der Retinal-Analoga

Abbildung 52 zeigt eine Übersicht über die Strukturen der Retinal-Analoga und die Absorptionsspektren der ungebundenen Retinale in Isopropanol. Die Bezugsquellen der Retinal-Analoga sind in Tabelle 6 aufgeführt.

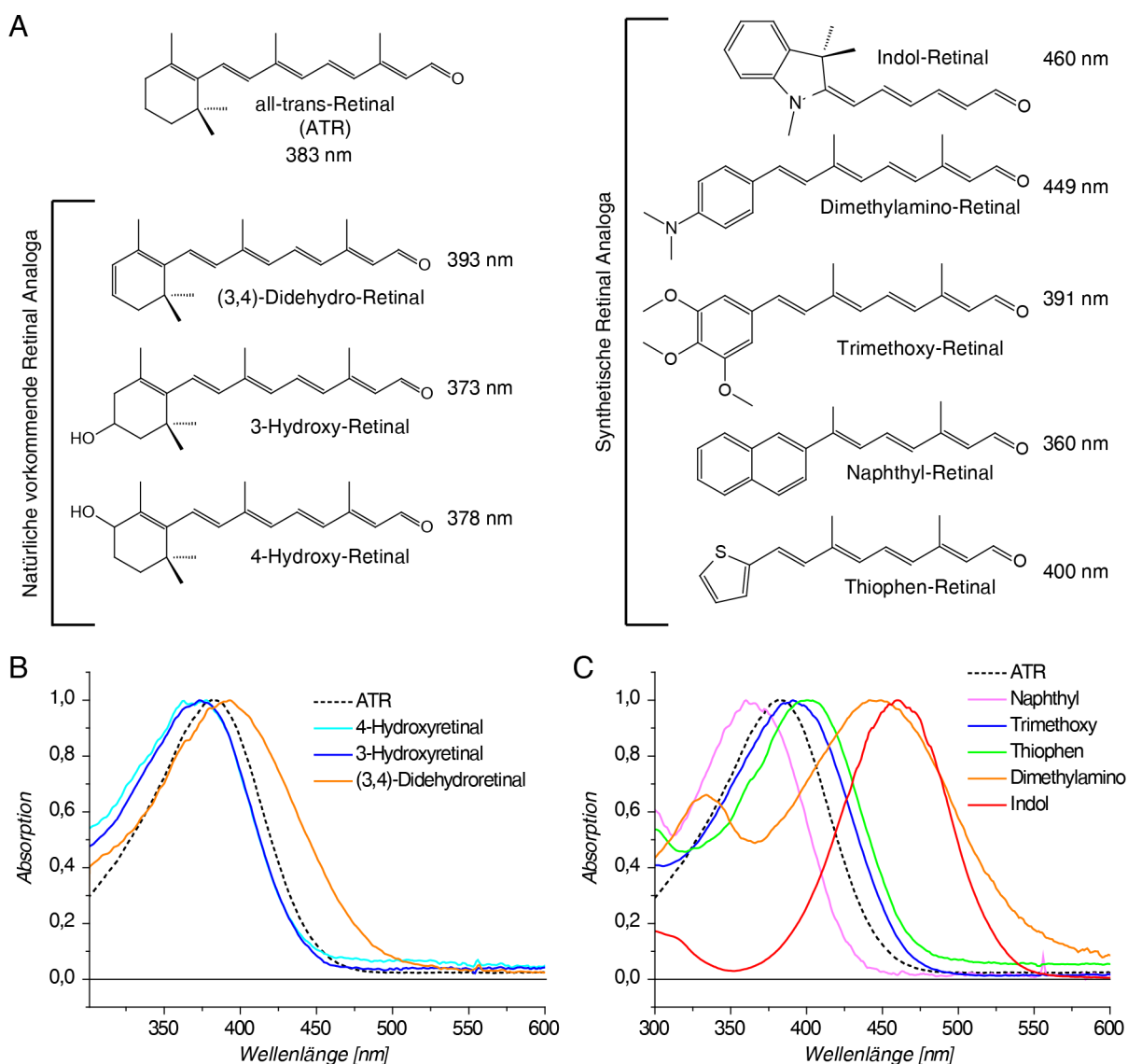


Abbildung 52: Strukturformeln und Absorptionsmaxima der Retinal-Analoga. Zur Übersicht wurden die Trivialnamen bzw. simplifizierte Namen gewählt. Die Analoga wurden in einer Konzentration von 0,02 mM in Isopropanol gemessen (Eppendorf BioSpectrometer basic). Die maximale Absorption wurde jeweils auf 1,0 normiert.

Das Indol-Retinal und Dimethylamino-Retinal zeigten mit Maxima bei 460 nm bzw. 449 nm gegenüber ATR die stärksten bathochromen Verschiebungen. Naphthyl-Retinal hatte trotz des ausgedehnten π -Elektronensystems das Maximum nur bei 360 nm und war somit hypsochrom verschoben. Hierbei fällt auf, dass Dimethylamino-Retinal ein zweites Maximum bei 330 nm aufweist. Es blieb unklar, ob das zweite Maximum eine intrinsische Eigenschaft des Analogons war oder durch Verunreinigungen verursacht wurde.

Die Retinale wurden zuerst in Oozyten zusammen mit hChR2-T159C-mCherry getestet (=ChR2-TC). Es wurde gleichzeitig eine umfangreiche Titration mit all-*trans*-Retinal (im Folgenden als ATR abgekürzt) an einer Oozyten-Charge desselben Frosches durchgeführt (Abbildung 53A). Entgegen den Erwartungen zeigten auch Konzentrationen über 1 μ M ATR deutliche Steigerungen der Photostromamplituden, obwohl die Löslichkeit von Retinoiden bei Raumtemperatur in wässrigen Puffern lediglich bei circa 0,1-0,2 μ M liegt [149]. Wahrscheinlich entstehen große Verluste durch Oxidation und andere Abbauvorgänge. Letztendlich führte diese Beobachtung dazu, dass alle Oozyten-Messungen in dieser Doktorarbeit mit 5 μ M ATR bzw. Analoga durchgeführt wurden. Die exakte Löslichkeit und die chemische sowie biologische Stabilität der einzelnen Analoga wurden nicht bestimmt. Eine offensichtliche toxische Beeinträchtigung der Oozyten und HEK-Zellen durch die Analoga konnte nicht beobachtet werden.

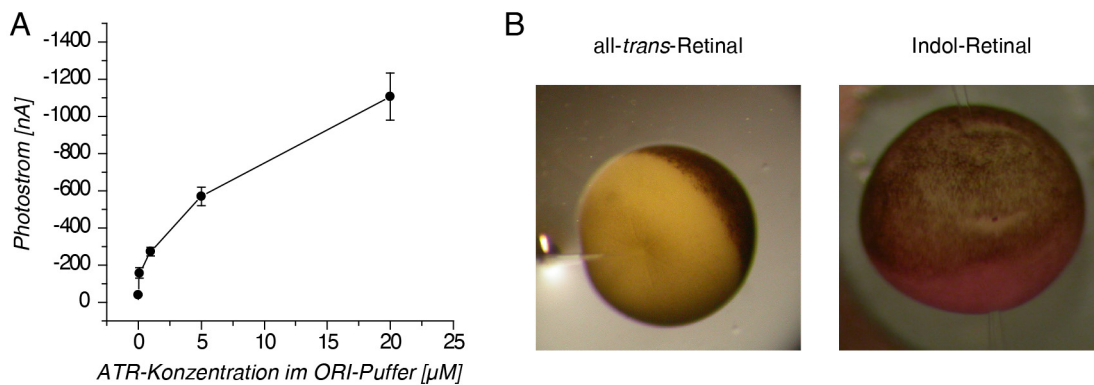


Abbildung 53: Untersuchung der Retinale in Oozyten. A: Abhängigkeit der stationären Photostromamplituden von der ATR-Konzentration am Beispiel von hChR2-T159C-mCherry (-75 mV, $pH_o=7.5$, 450 nm-Filter). Folgende finale ATR-Konzentration wurden getestet: 0.0 μ M [n=3], 0.1 μ M [n=5], 1.0 μ M [n=4], 5.0 μ M [n=5], 20.0 μ M [n=5]. B: Retinal-Analoga können zu unerwarteten Nebeneffekten führen. Indol-Retinal führt zu unspezifischem Anfärben von organischem Material. Gezeigt sind nicht injizierte Oozyten mit ATR und dem Indol-Retinal.

Das rotverschobene Indol-Retinal (bzw. Cyanin-Indol oder Merocyanin) führte in Oozyten zwar zu keinen Verschiebungen in den Aktionsmaxima, aber färbte unspezifisch auch nicht-injizierte Oozyten tiefrot (Abbildung 53B). Beim ebenfalls rotverschobenen Dimethylamino-Retinal konnte dies nicht beobachtet werden. Daher wurde mit dem Indol-Retinal nicht weitergearbeitet.

Die Experimente in Oozyten führten zu unerwarteten Ergebnissen. Hierzu gehörten reduzierte Photostromamplituden bzw. deren völliges Fehlen, keine Verschiebungen in den Aktionsmaxima sowie veränderte Kinetiken. Als einen wichtigen Störfaktor wurden die schwer kontrollierbaren Einflüsse durch endogene Retinale in Oozyten angesehen [134]. Daher wurden die Experimente in Oozyten nicht fortgesetzt und auf HEK-Zellen verlagert. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt gezeigt.

2.6.2 Photoströme von ChR2 und Arch-3 mit Retinal Analoga in HEK293-Zellen

In den HEK293-Zellen zeigte sich wie in Oozyten das Problem, dass die Zellen bereits ohne Retinal-Zugabe Photoströme zeigten. HEK293-Zellen sollten selbst kein Retinal produzieren, jedoch enthält Kalbserum als Standard-Zusatz in der Zellkultur circa 0,5 μM Vitamin A bzw. 30 nM Retinol [150, 151]. Daher musste eine serumfreie Zellkultur etabliert werden (für Details siehe Abschnitt 4.3.2). Nach der Etablierung wurden Experimente mit ChR2-YFP und Arch-3-EGFP durchgeführt. Für Arch-3 wurden die Zellen transient transfiziert. Dagegen wurde für ChR2 eine stabile HEK293-Zelllinie eingesetzt [128]. Im Gegensatz zu den Oozyten-Experimenten wurde das Zellkulturmedium nur mit je 1 μM Retinal-Analoga als Endkonzentration supplementiert. Typische Stromkurven der stabilen ChR2-Zelllinie nach Inkubation mit den Retinal-Analoga sind in Abbildung 54 gezeigt.

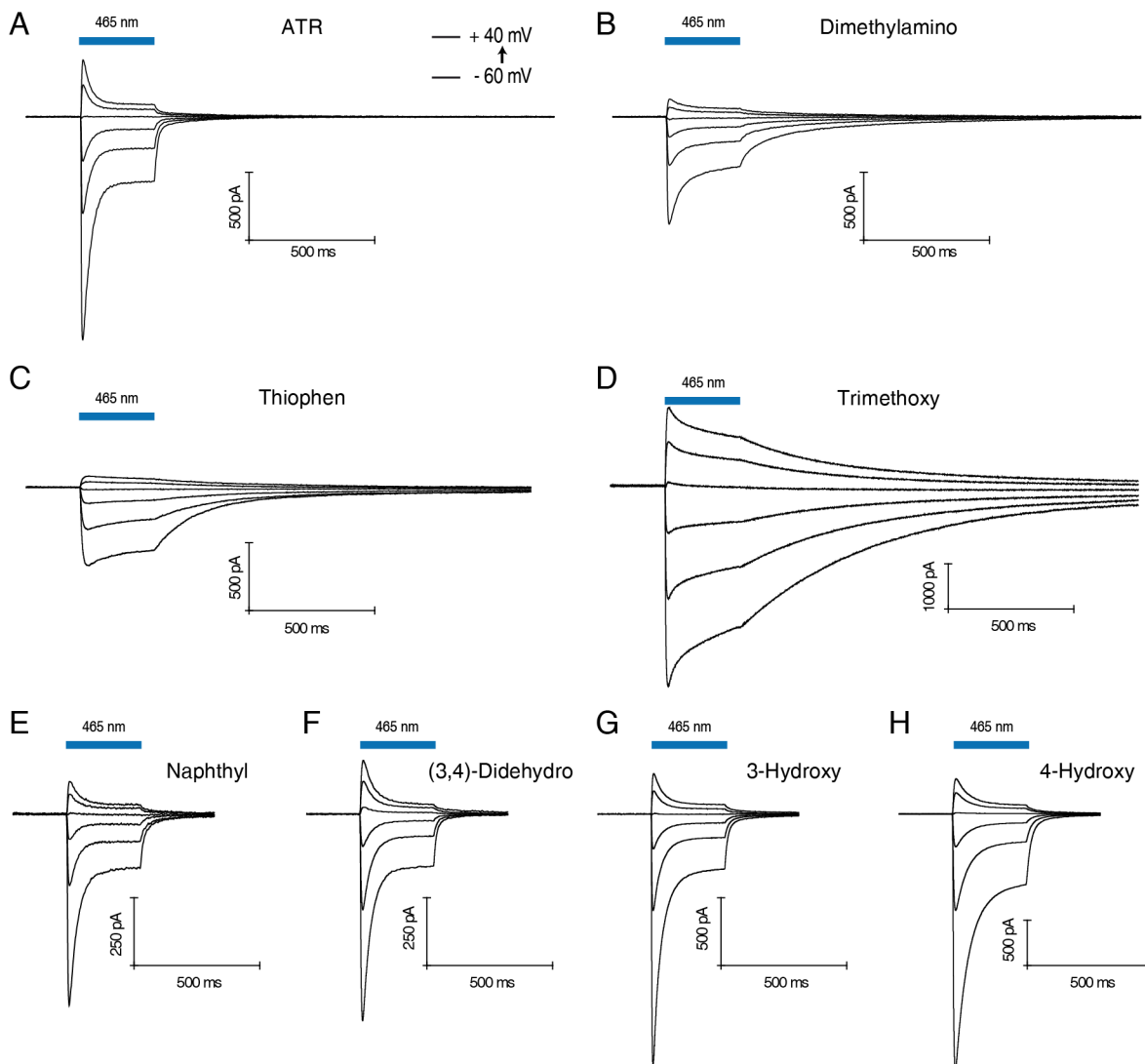


Abbildung 54: Typische Stromspuren von ChR2-WT mit verschiedenen Retinal-Analoga. Die Zellen wurden 24h nach Induktion der Expression mit Tetrazyklin und Zugabe des jeweiligen Retinals (Endkonzentration 1 μM) gemessen. Die Belichtung erfolgte mit einem „Polychrom-V“ (TILL Photonics, Deutschland) bei $465 \pm 7 \text{ nm}$ für je 300 ms (entspricht 0.150 mW/mm^2) und bei Haltespannungen von -60 mV bis +40 mV.

Die Stromspuren der getesteten Retinal-Analoga lassen sich anhand ihrer Wirkungen in zwei Klassen einteilen:

1. Die erste Klasse ist dadurch charakterisiert, dass sich die ChR2-Stromspuren der Retinal-Analoga und ATR ähneln. Dies betrifft das synthetische Naphthyl-Retinal sowie alle natürlichen Retinal Analoga.
2. Dagegen gehören das Dimethylamino-, Thiophen und das Trimethoxy-Retinal zur zweiten Klasse, welche durch eine deutlich erhöhte *off*-Kinetik gekennzeichnet ist.

Die unterschiedlichen *off*-Kinetiken und die absoluten Photostrom-Amplituden der getesteten Retinale sind in Abbildung 55 gezeigt. Mit Hinblick auf die Kinetik ist das Trimethoxy-Retinal am auffälligsten, weil es unter allen Analoga mit $\tau_{off} \approx 800$ ms am langsamsten war und die größten Photostromamplituden zeigte. Das Trimethoxy-Retinal beansprucht interessanterweise von allen untersuchten Retinal-Analoga den meisten Platz innerhalb des Proteins. Das Dimethylamino-Retinal ist zwar auch durch eine etwas langsamere Kinetik von $\tau_{off} \approx 100$ ms gekennzeichnet, jedoch sind die absoluten Stromamplituden im Vergleich zu ATR reduziert. Daher kann geschlussfolgert werden, dass eine langsame Kinetik nicht unmittelbar mit höheren Stromamplituden korreliert.

Von den natürlichen Retinalen ist das (3,4)-Didehydroretinal in Abbildung 55B am interessantesten, weil es durch reduzierte Amplituden gekennzeichnet ist. Diese Beobachtung hat Bedeutung für optogenetische Anwendungen und für die Grundlagenforschung an Rhodopsinen in Systemen mit endogenen Retinal-Derivaten (siehe Diskussion im Abschnitt 3.4).

Unabhängig von den Retinal-Analoga zeigt Abbildung 55B sehr gut den Einfluss des fetalen Kälberserums im Zellmedium, weil das Serum offenbar als Retinal-Quelle dient. Demnach wäre sogar eine Zugabe von ATR in Anwesenheit des Serums bei der hier verwendeten stabilen Zelllinie nicht notwendig gewesen.

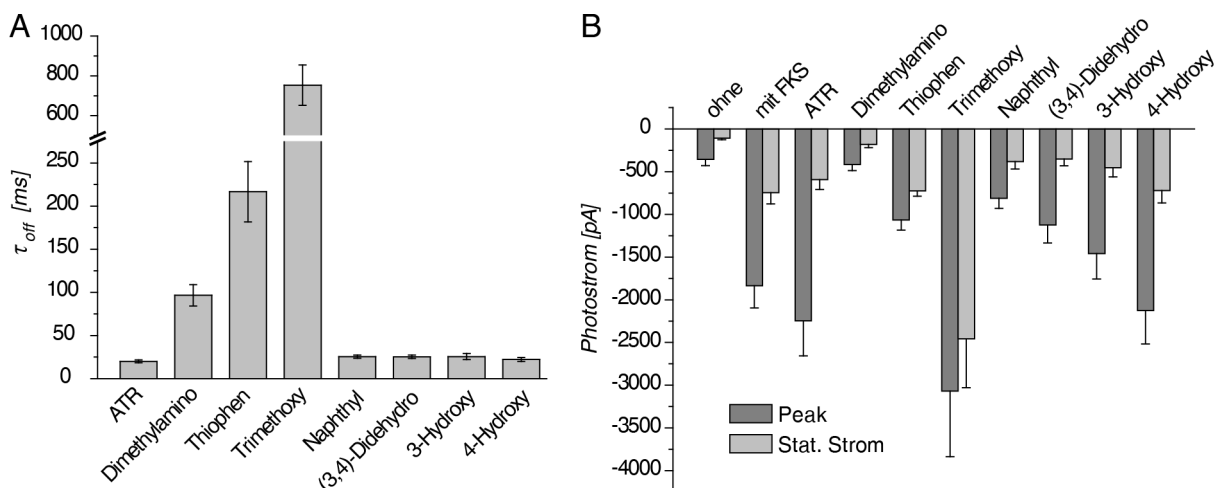


Abbildung 55: Kinetiken und Amplituden von ChR2-WT mit verschiedenen Retinal-Analoga. Die Messungen erfolgten wie in Abbildung 54. A: Gezeigt sind die *off*-Kinetiken bei -60 mV. Die Werte wurden durch monoexponentiellen Fit bestimmt (von links nach rechts: n=12/6/8/6/3/11/6/6). B: Absolute Amplituden der Peak-Ströme und der stationären Ströme bei -60 mV (von links nach rechts: n=16/13/11/7/7/5/6/13/7/6).

Im Weiteren wurden die Aktionsspektren von ChR2 bestimmt, welche in Abbildung 56 gezeigt sind. Die Verschiebungen der Maxima der natürlichen Retinale gegenüber ATR entsprachen dabei den Erwartungen aus den Absorptionsspektren der freien Retinale (Abbildung 52). Für das Trimethoxy-

und das Thiophen-Retinal wurden bathochrome Verschiebungen erwartet, jedoch wurde der entgegengesetzte Effekt beobachtet. Beide zeigten eine hypsochrome Verschiebung um 5 nm. Auch das Naphthyl-Retinal zeigte eine hypsochrome Verschiebung um 15 nm, jedoch entsprach dies den Erwartungen. Unter den synthetischen Retinalen zeigte allein das Dimethylamino-Retinal eine kleine bathochrome-Verschiebung um 10 nm, wobei das freie Analogon um circa 70 nm bathochrom verschoben war.

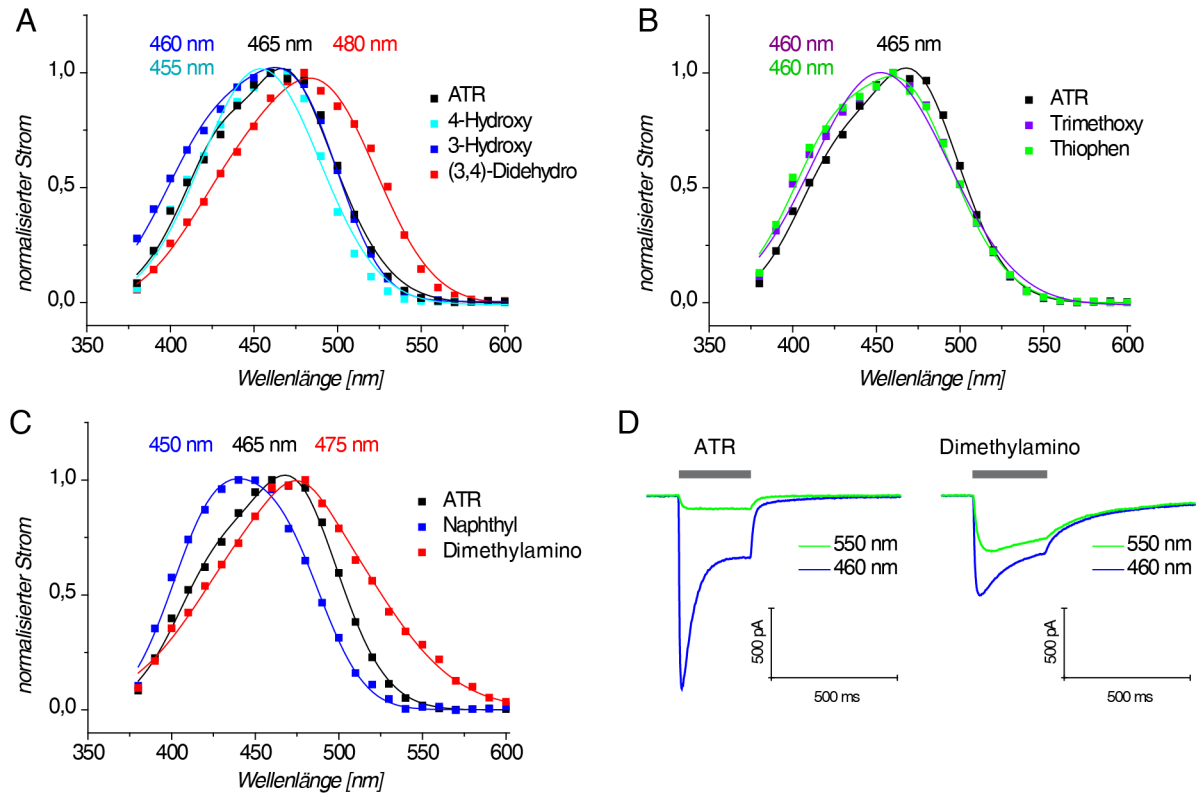


Abbildung 56: Aktionsspektren von ChR2 mit verschiedenen Retinal-Analoga. A-C: Die Belichtung erfolgte mit einem Polychrom-V (in 10 ± 7 nm Schritten, -60 mV, jeweils 10 ms Belichtung). Hierbei wurde der maximale Peak-Strom ausgewertet. Der Photonenfluss betrug bei allen Wellenlängen 2.8×10^{13} Photonen $s^{-1} mm^{-2}$. $n_{ATR}=7$, $n_{Dehydro}=3$, $n_{3OH}=5$, $n_{4OH}=3$, $n_{Trimethoxy}=6$, $n_{Thiophen}=4$, $n_{Naphthyl}=6$, $n_{Dimethylamino}=7$. D: Vergleich der Photoströme einer Zelle mit ATR und einer anderen Zelle mit Dimethylamino-Retinal (beide bei -60 mV). Die jeweilige Zelle wurde sowohl bei 460 ± 7 nm (0.158 mW/mm²) als auch bei 550 ± 7 nm (0.132 mW/mm²) belichtet.

Für optogenetische Anwendungen von Retinal-Analoga zum „color-tuning“ ist entscheidend, dass die Analoga nicht nur qualitativ im Spektrum, sondern auch quantitativ in den Stromamplituden besser als ATR sind. Um dies experimentell zu testen, wurden ATR und das rot verschobene Dimethylamino-Retinal direkt bei gleichem Photonenfluss verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 56D gezeigt. Hierbei wurde zuerst die Photoströme einer Zelle (+ATR) sowohl bei 460 nm als auch bei 560 nm gemessen. Wie erwartet sind die Photoströme bei 460 nm größer als bei 550 nm. Dagegen zeigte eine Zelle, welche mit Dimethylamino-Retinal inkubiert wurde, nur eine geringe Reduzierung der Stromamplituden, wenn mit 550 nm statt mit 460 nm belichtet wurde. Beim Vergleich der Amplituden mehrerer Zellen mit ATR als auch Dimethylamino-Retinal (bei 465 nm) zeigte sich jedoch, dass die Amplituden der stationären Ströme von ATR generell circa dreimal größer als mit dem Dimethylamino-Retinal sind (Abbildung 55B). Demnach ist der Vorteil der Rotverschiebung durch das Dimethylamino-Retinal aufgrund der allgemein niedrigeren Amplituden nur gering.

Arch-3 wurde als Stellvertreter für die Protonenpumpen zum Test der Analoga gewählt. Der Grund hierfür lag in der Bedeutung von Arch-3 in der Optogenetik. Die gewonnenen Ergebnisse sind in

Abbildung 57 zeigt. Die Untersuchung der Eigenschaften von Protonenpumpen anhand von Arch-3 in Kombination mit Retinal-Analoga gestaltete sich deutlich schwieriger, weswegen in Abbildung 57 nur die Spektren und die absoluten Stromamplituden gezeigt sind. Als Gründe sind die transiente Transfektion statt einer stabilen Zelllinie, die allgemein schlechte Verfassung von Zellen ohne Serum und vor allem die niedrigen Stromamplituden der Pumpen zu nennen. Die Experimente wurden auf die synthetischen Retinale begrenzt.

Interessanterweise zeigten die Retinal-Analoga in Kombination mit Arch-3 deutlich andere Effekte als mit ChR2. Am auffälligsten sind die Unterschiede in den Aktionsspektren, welche sich in zwei wesentliche Punkte zusammenfassen lassen:

1. Die Verschiebungen in den Aktionsspektren sind viel stärker ausgeprägt als bei ChR2. So führte das Naphthyl-Retinal zu einer Blauverschiebung von 60 nm, während diese Verschiebung in ChR2 nur 15 nm betrug.
2. Des Weiteren ist festzustellen, dass das Methoxy-Retinal und das Dimethylamino-Retinal überhaupt keine Ströme zeigten. Die Besonderheit daran ist, dass sowohl bei Arch-3 als auch bei ChR2 ohne Retinal meist noch ein kleiner Photostrom beobachtet werden konnte. Beim Methoxy- und Dimethylamino-Retinal waren überhaupt keine lichtinduzierten Ströme zu sehen. Daraus ist zu schlussfolgern, dass diese beiden Analoga offenbar zuverlässig eingebaut werden, aber dem Protein keine messbare Funktionalität verleihen.

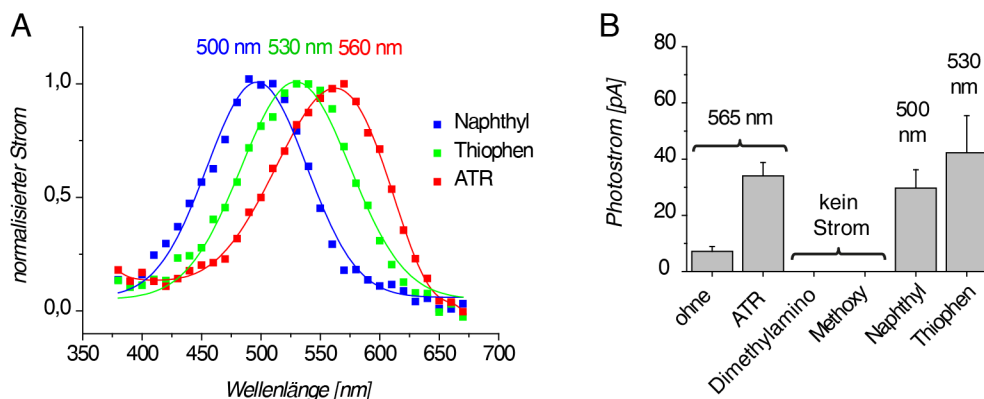


Abbildung 57: Spektren und Amplituden der synthetischen Retinal-Analoga in Kombination mit Arch-3. HEK293-Zellen wurden 24-30 h vor der Messung transfiziert (1 μ M Retinal-Analogen, bei 0 mV, 300 ms Belichtung). A: Aktionsspektren der stationären Ströme bei einem stets gleichen Photonenfluss von 2.8×10^{14} Photonen $s^{-1} mm^{-2}$ in 10 ± 7 nm Schritten ($n_{ATR}=3$, $n_{Thiophen}=8$, $n_{Naphthyl}=7$). Im Unterschied zu den Experimenten an ChR2 wurde für Arch-3 kein 10 % Neutral-Filter verwendet, weswegen der Photonenfluss um den Faktor 10x größer ist (vgl. Abbildung 56). B: Amplituden der stationären Stromamplituden bei den jeweils angegebenen Wellenlängen (0.080 - 0.110 mW/ mm^2 je nach Wellenlänge, $n_{ohne}=6$, $n_{ATR}=14$, $n_{Dimethyl}=3$, $n_{Methoxy}=3$, $n_{Naphthyl}=4$, $n_{Thiophen}=5$).

Davon abgesehen, dass das Dimethylamino- und Methoxy-Retinal überhaupt keine Ströme zeigten, sind die absoluten Stromamplituden vom Naphthyl- und Thiophen-Retinal mit denen von ATR vergleichbar.

Grundsätzlich wurde bei den Retinal-Analoga Experimenten an ChR2 und Arch-3 erwartet, dass sich das Aktionsspektrum entsprechend der Absorptionsspektren der freien Retinalen verschieben würde. Die hier gezeigten Experimente zeigen jedoch, dass die Wechselwirkungen von Rhodopsinen mit Retinal-Analoga komplexer sind.

3 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die meisten Protonenpumpen sich im Wesentlichen wie Bakteriorhodopsin verhalten. Die elektrophysiologische Untersuchung des *Gloeobacter*-Rhodopsins bestätigte jedoch Experimente zum „Green-Proteorhodopsin“ [54, 55], dass einige Protonenpumpen auch einwärts gerichtete Photoströme bei hohen, der Pumprichtung entgegengesetzten, elektrochemischen Gradienten zeigen. Aus dieser Beobachtung entwickelte sich der Schwerpunkt der Arbeit, welcher die Untersuchungen des Phänomens der einwärts gerichteten Photoströme anhand von mutierten Protonenpumpen darstellt. Parallel dazu stellte sich stets die Frage nach den strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen Protonenpumpen und Kanalrhodopsinen.

Eine der zentralen Erkenntnisse dieser Doktorarbeit ist, dass Protonenpumpen in passive Transporter umgewandelt werden können. Bei den meisten der untersuchten Konstrukte zeigte sich ein Dualismus aus einer passiven Protonenleitfähigkeit und einer Rest-Pumpaktivität. Da diese Beobachtung eine allgemeine Bedeutung sowohl für Pumpen als auch Kanalrhodopsine hat, wird dem Pump-Kanal-Dualismus in der folgenden Diskussion eine zentrale Rolle zuteil.

3.1 Untersuchung des Pump-Kanal-Dualismus

3.1.1 Theoretische Überlegungen zum Pump-Kanal-Dualismus

Das Vorhandensein eines aktiven sowie passiven Protonentransportes wurde dadurch identifiziert, dass sowohl auswärts als auch einwärts gerichtete Photoströme beobachtet werden konnten. Dabei waren die experimentell bestimmten Umkehrpotentiale negativ zu den theoretisch erwarteten Umkehrpotentialen für passiven Protonentransport verschoben. Daraus ist zu schlussfolgern, dass ein passiver Protonentransport „zusammen“ mit einem aktiven auswärts gerichteten Pumptransport erfolgte. Es stellt sich nun die Frage, wie ein Protein überhaupt zu einem solchen Dualismus in der Lage sein kann.

Mikrobielle Rhodopsine sind mit 30-40 kDa im Vergleich zu aktiven Ionentransportern aus anderen Proteinklassen sehr klein und simpel aufgebaut. Daher ist anzunehmen, dass der aktive und passive Protonentransport größtenteils über den gleichen räumlichen Bereich innerhalb des Proteins erfolgt. Im Folgenden werden drei einfache spekulative Modelle als Erklärung für einen Pump-Kanal-Dualismus vorgestellt, welche in Abbildung 58 gezeigt sind. Diese Modelle dienen als einführende Grundlage für die Untersuchung des Pump-Kanal-Dualismus. Im Anschluss werden weitere theoretische Überlegungen zum Pump-Kanal-Dualismus geschildert, um im nachfolgenden Abschnitt eine Diskussionsgrundlage für die experimentellen Ergebnisse zu liefern.

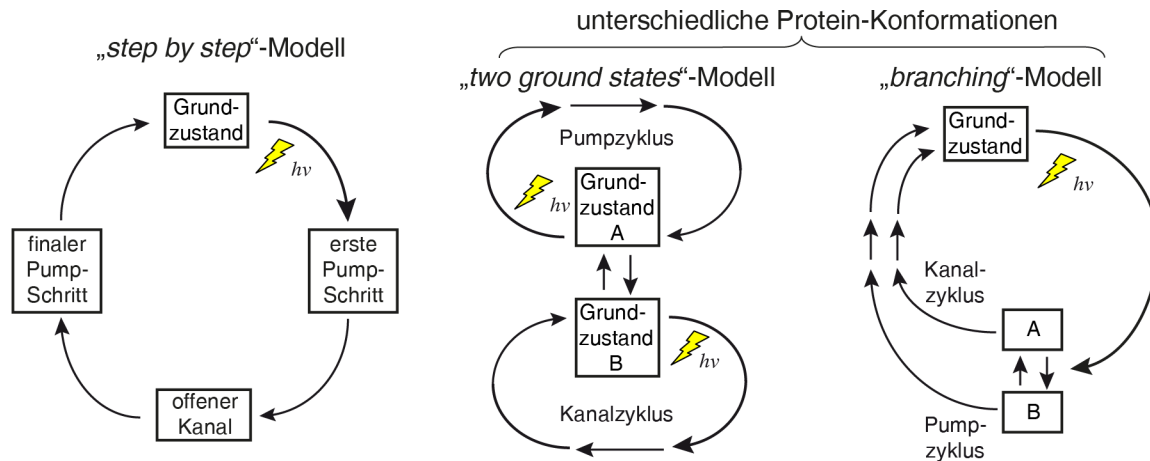


Abbildung 58: Verschiedene spekulative Modelle des Pump-Kanal-Dualismus in Form von schematischen Photozyklen. Die Teilschritte symbolisieren keine klassischen spektroskopischen Photointermediate, sondern können sowohl Zustände als auch Prozesse sein. Die einzelnen Varianten werden im Text näher erläutert. Zusätzliche wären auch Kombinationen aus allen drei Varianten oder auch zusätzliche Seitenwege denkbar.

1. „Step by step“-Modell: Dieses Modell geht davon aus, dass der Pumpprozess und die Ausbildung eines Protonenkanals in einem gemeinsamen Photozyklus erfolgt. Der Pump-Kanal-Dualismus wird realisiert, indem die Ausbildung eines Protonenkanals und die Pumpaktivität in zeitlich versetzten Teilen des Photozyklus stattfinden. Die Ausprägung des passiven Kanalstromes würde nur von der Kinetik des offenen Kanalzustandes und vom elektrochemischen Gradienten bestimmt werden. Das in Abbildung 58 gezeigte Modell ist nur eine mögliche Variante des „step by step“-Modells. Es wäre auch vorstellbar, dass der komplette Pumpprozess bereits abgeschlossen ist, bevor sich ein passiver Protonenkanal ausbildet.
2. „Two ground states“-Modell: Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass das Rhodopsin in zwei unterschiedlichen Grundzuständen existiert und durch Lichtanregung verschiedene Photozyklen durchläuft. Die Grundzustände selbst könnten sich zum Beispiel in der Protonierung einzelner Reste oder verschiedener Retinal-Konformationen unterscheiden. Hierbei wäre anzunehmen, dass die beiden Grundzustände in einem Gleichgewicht vorliegen. Die Lage des Gleichgewichtes könnte von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Spannung, Vorbelichtung, Temperatur und anderen Faktoren abhängen.
3. „Branching“-Modell: Grundsätzlich ist dieses Modell mit dem „two ground states“-Modell verwandt. Auch hier wird angenommen, dass das Rhodopsin in unterschiedlichen strukturellen Zuständen vorkommt, welches durch verschiedene Faktoren bestimmt wird. Der Unterschied zum „two ground states“-Modell ist der, dass erst innerhalb des Photozyklus eine Aufspaltung in konkurrierende strukturell unterschiedliche Photozyklus-Intermediate mit eigenen Photozyklus-Seitenwegen erfolgt.

Prinzipiell wäre auch eine Kombination aus diesen Modellen denkbar, wodurch der Pump-Kanal-Dualismus einen noch komplexeren Photozyklus aufweisen würde. Diese Variante wäre für das menschliche Verständnis nicht wünschenswert, muss aber in Betracht gezogen werden. Im Verlauf der weiteren Diskussion wird sich tatsächlich herausstellen, dass keines der Modelle allein für sich die Beobachtungen aller Konstrukte erklären kann.

Mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen lassen sich einzelne Photointermediate nicht oder nur sehr eingeschränkt identifizieren. Allerdings sind die elektrophysiologischen Messungen fundamental

gewesen, um überhaupt den Pump-Kanal-Dualismus zu entdecken und zu beschreiben. Glücklicherweise bieten die elektrophysiologischen Daten dennoch folgende Indizien und Informationsquellen, um den Pump-Kanal-Dualismus besser zu verstehen:

„Peak-Ströme“ in der Nähe der Umkehrpotentiale: Hilfreiche Indizien zur Identifizierung und Charakterisierung des Pump-Kanal-Dualismus liefern die transienten Peak-Ströme in der Nähe der Umkehrpotentiale, welche oft zusätzlich zu den stationären Photoströmen beobachtet wurden. Diese Peak-Ströme hatten oft entgegengesetzte Vorzeichen im Vergleich zu den stationären Photoströmen. Tatsächlich sind diese Peak-Ströme ein klares Indiz für die Existenz des Pump-Kanal-Dualismus, denn diese lassen sich sehr gut durch eine Überlagerung aus Pump- und Kanalstrom erklären. Eine andere Ionenselektivität konnte zumindest für das *Gloeobacter*-Rhodopsin ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 2.2.1). Mit Hilfe dieser Peak-Ströme lassen sich die kinetischen Parameter und Amplituden des jeweiligem Pump- und Kanalanteils abschätzen. Wenn diese Peak-Ströme tatsächlich durch eine solche Überlagerung zustande kommen, dann sind diese nur scheinbar transiente Peak-Ströme. Es handelt sich dann um stationäre Ströme, welche durch die Überlagerung entgegen gesetzter Ströme sichtbar werden, wenn diese sich zugleich kinetisch unterscheiden. Demnach wäre zwischen scheinbaren und realen transienten Peak-Strömen zu unterscheiden. Abbildung 59 zeigt drei schematische Varianten einer solchen Überlagerung aus einem Pump- und Kanalstrom.

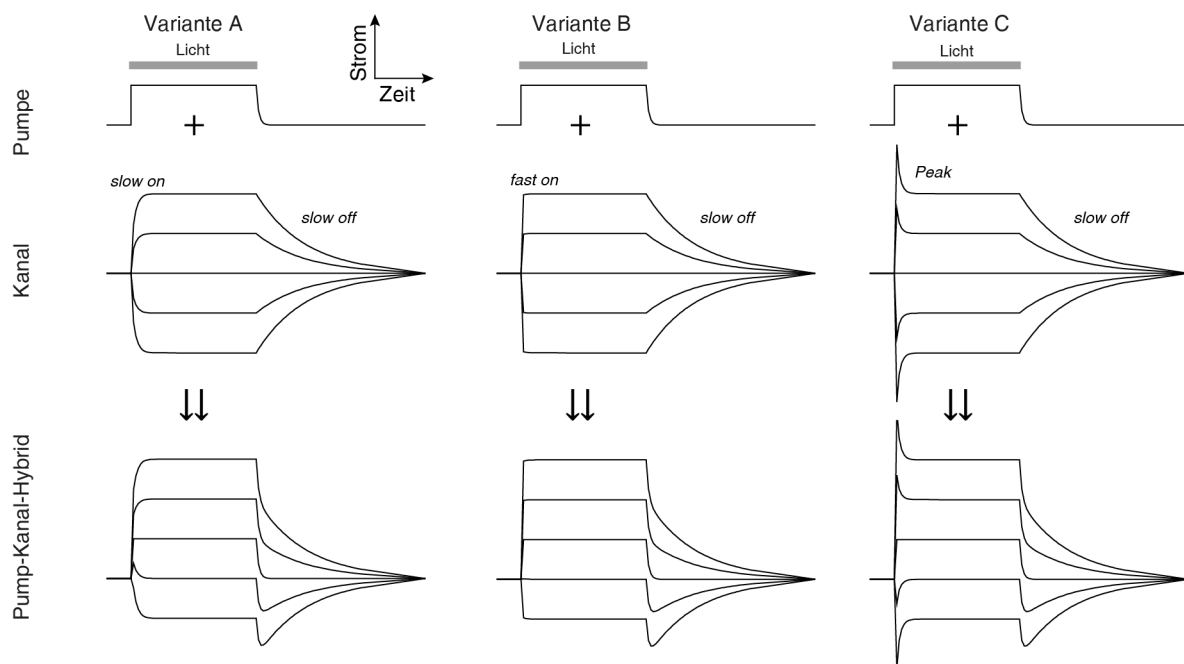


Abbildung 59: Erklärung der Peak-Ströme durch Addition eines aktiven Pumpstroms mit einem passiven Protonentransport. Für die hier gezeigten theoretischen Varianten wurde angenommen, dass der Pumpstrom unabhängig vom elektrochemischen Gradienten ist. Der Kanalstrom ist dagegen unmittelbar vom elektrochemischen Gradienten abhängig.

Für diese einfachen Modelle der Stromspuren wurde angenommen, dass der Pumpstrom eine schnellere *off*-Kinetik gegenüber dem Kanalstrom aufweist und unabhängig von der angelegten Spannung ist. Zur Einfachheit wurde auf reale transiente Peak-Ströme bei den Pumpströmen verzichtet. Im Gegensatz dazu sind die Photoströme des passiven Protonentransportes direkt vom elektrochemischen Gradienten abhängig, weswegen sowohl auswärts als auch einwärts gerichtete Photoströme zu beobachten sind. In Abbildung 59 wurde lediglich die *on*-Kinetik des passiven Protonentransporters variiert. Wenn die *on*-Kinetik des Kanals langsamer als die der Pumpe ist, dann

ergibt sich Variante A. Bei gleicher *on*-Kinetik von Pumpe und Kanal ergibt sich Variante B. Aus sehr schnellen oder stark dominierenden realen transienten Kanal-Peak-Strömen ergibt sich Variante C.

Die hier gezeigten Varianten sind nur eine kleine Auswahl an theoretischen Kombinationen. Durch unterschiedliche kinetische Parameter und Amplituden der Pump- und Kanalanteile wäre die große Variation an Stromspur-Mustern erklärbar, welche in dieser Arbeit beobachtet wurde.

Umkehrpotentiale: Die wohl wichtigsten Informationsquellen zur Einschätzung der Pumpkraft sind die direkt bestimmten und extrapolierten Umkehrpotentiale. Die Umkehrpotentiale eines passiven Protonentransporters in Oozyten liegen genau im experimentellen Messbereich der hier durchgeführten Experimente (siehe Abbildung 14A). Daher bietet die Bestimmung der Umkehrpotentiale direkt Auskunft über die Existenz einer Pumpaktivität. Mit Hinblick auf die nachfolgenden Diskussionen muss die Frage gestellt werden, welche Umkehrpotentiale für aktive und passive Protonentransporter überhaupt erwartet werden:

1. Im einfachsten Fall liegt keine Pumpaktivität vor und die Umkehrpotentiale entsprechen direkt den theoretisch erwarteten Umkehrpotentialen für passiven Protonentransport.
2. Wenn eine ideale Pumpaktivität vorliegt, dann existieren keine messbaren Umkehrpotentiale. Es können, wenn überhaupt, nur hypothetische extrapolierte Umkehrpotentiale angegeben werden.
3. Wenn ein Pump-Kanal-Dualismus mit konstanter Pumpkraft vorliegt (PMF= konstant), dann würden sich ein Verhalten wie in Abbildung 60A ergeben. Dies könnte zum Beispiel der Fall sein, wenn der Pump-Kanal-Dualismus dem „*step by step*“-Modell entspricht. Pro Photozyklus würde immer genau ein Proton aktiv transportiert werden. Zusätzlich können im gleichen Photozyklus passiv Protonen transportiert werden, wenn ein elektrochemischer Gradient existiert. Die tatsächliche Anzahl der zusätzlich zum Pumpstrom passiv transportierten Protonen hängt vom Gradienten und der „Effizienz“ des passiven Kanalzustandes ab. Die absolute Anzahl der passiv transportierten Protonen hat jedoch keinerlei Einfluss auf das Umkehrpotential selbst. Ein Verhalten wie Abbildung 60A wäre jedoch auch beim „*two ground states*“- oder dem „*branching*“-Modell denkbar, wenn das Gleichgewicht zwischen dem „Pumpmodus“ und dem „Kanalmodus“ nicht vom elektrochemischen Gradienten abhängt.
4. Falls jedoch vor oder während des Photozyklus zwei oder mehrere strukturell verschiedene Zustände vorliegen, deren Gleichgewicht vom elektrochemischen Gradienten abhängt, dann könnten sich Umkehrpotentiale wie in Abbildung 60B ergeben. Je nach elektrochemischen Gradienten würden sich die Rhodopsine bevorzugt im „Pumpmodus“ oder im „Kanalmodus“ befinden. Alternativ oder zusätzlich zum „Kanalmodus“ könnten elektrophysiologisch inaktive Zustände auf Kosten des „Pumpmodus“ existieren.

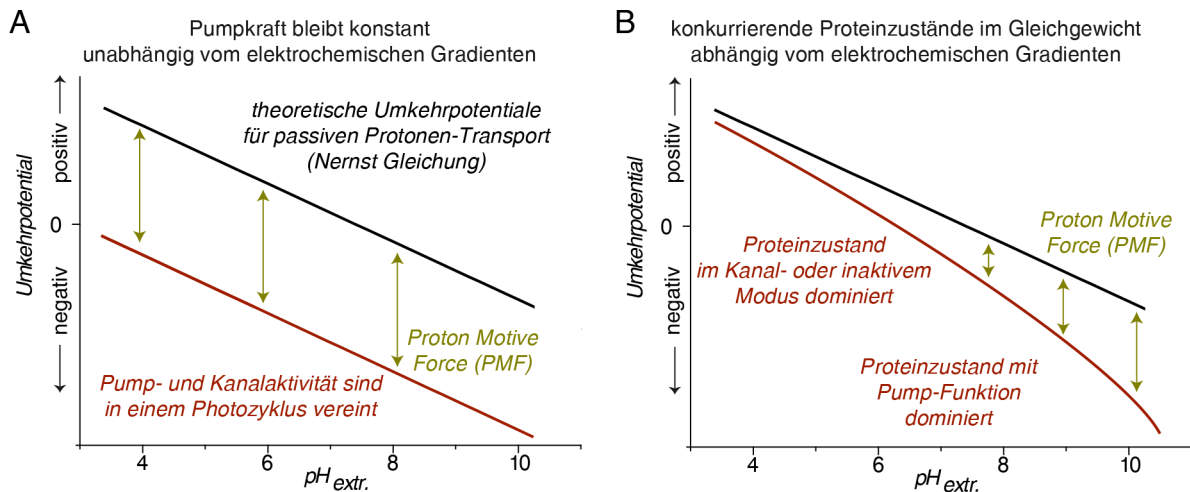


Abbildung 60: Umkehrpotentiale eines hypothetischen Konstruktes mit Pump-Kanal-Dualismus. Die schwarze Linie zeigt die Umkehrpotentiale für passiven Protonentransport, während die rote Linie den Verlauf der Umkehrpotentiale des hypothetischen Konstruktes zeigt. A: Die experimentellen Umkehrpotentiale verlaufen parallel zu den Umkehrpotentialen für passiven Transport (PMF=konstant). Dies wäre der Fall, wenn Pump- und Kanalaktivität in einem Photozyklus vereint sind. B: Dieser Kurvenverlauf ergibt sich, wenn ein Gleichgewicht aus einem Pump-, Kanal- oder inaktiven Modus vorliegt. Dieses Gleichgewicht wäre vom elektrochemischen Gradienten abhängig.

Zusammengefasst lässt sich zu den Umkehrpotentialen sagen, dass diese besonders zur grundlegenden Identifikation eines Pump-Kanal-Dualismus geeignet sind. Nach der theoretischen Betrachtung der Umkehrpotentiale ließe sich das „step by step“-Modell als eine mögliche Erklärung für den Pump-Kanal-Dualismus bestätigen bzw. ausschließen. Wenn sich die PMF einer Pumpe mit Pump-Kanal-Dualismus im Experiment bei verschiedenen elektrochemischen Bedingungen nicht ändert (Abbildung 60A), dann würde diese Beobachtung für das „step by step“-Modell sprechen. Dagegen können das „two ground states“- oder das „branching“-Modell mit Hilfe der Umkehrpotentiale weder eindeutig bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Laser-Messungen: Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur wenige Laser-Messungen durchgeführt werden, wovon auch nur Ergebnisse zum GR-WT gezeigt sind. Laser-Messungen können jedoch in Zukunft essenziell zum Verständnis des Pump-Kanal-Dualismus sein, weswegen Laser-Messungen als Informationsquelle hier explizit erwähnt werden (siehe hierzu „Ausblick für die Rhodopsin-Forschung“ im Abschnitt 3.5).

Mutationsanalyse und Doppelmutanten: Eine weitere Informationsquelle zum Verständnis des Pump-Kanal-Dualismus kann die gezielte Einführung von Mutationen an Positionen sein, welche vermutlich für den Kanal- oder Pumpstrom elementar sein könnten. Bei Mutanten besteht jedoch immer die Gefahr zusätzliche artifizielle Effekte zu verursachen, wie zum Beispiel Expressions- oder Faltungseffekte. Daher wurden in dieser Arbeit die wichtigsten Mutanten in mehreren Rhodopsinen getestet, um solche Gefahren zu minimieren.

3.1.2 Vergleich der experimentellen Daten mit den theoretischen Überlegungen

Bei allen untersuchten Konstrukten mit Pump-Kanal-Dualismus ist das *Gloeobacter*-Rhodopsin am interessantesten, weil hier der passive Strom bereits beim Wild-Typ auftritt. Die experimentell beobachteten Peak-Ströme in der Nähe der Umkehrpotentiale von GR-WT (Abbildung 61A) stimmen sehr gut mit der Vorstellung überein, dass ein schneller Pumpstrom mit einem langsamen passiven Strom überlagert ist (siehe Abbildung 59, Variante A). Die Laser-Messungen zu GR-WT (Abbildung 23) haben ebenfalls bestätigt, dass der einwärts gerichtete Strom (=passive Transportmodus) im Vergleich zum Pumpprozess langsamer ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Ein-Photon-Anregung bereits ausreicht, um in GR-WT einwärts gerichtete Ströme zu beobachten.

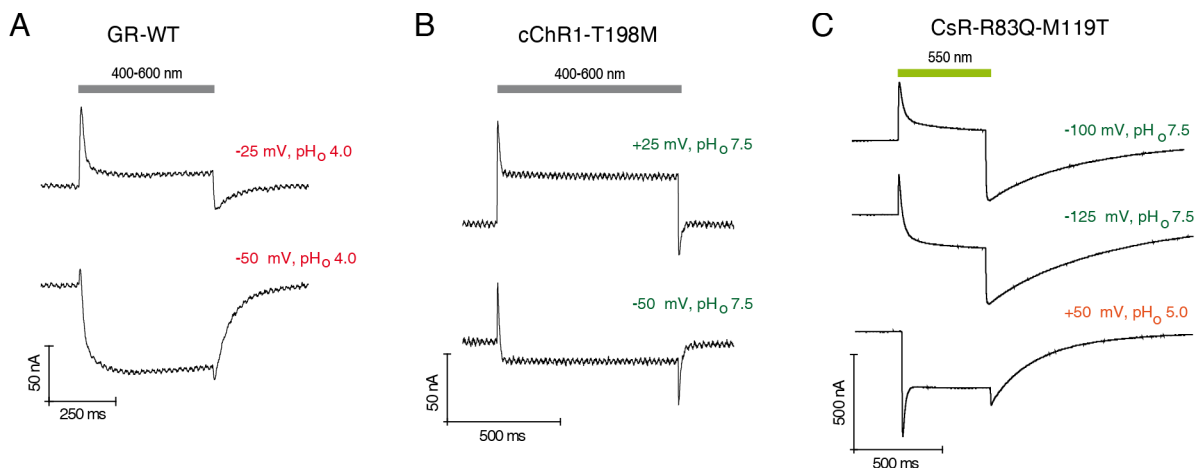


Abbildung 61: Vergrößerte Darstellung von Pumpen mit Pump-Kanal-Dualismus in der Nähe der jeweiligen Umkehrpotentiale. Die scheinbaren Peak-Ströme werden durch Überlagerung eines stationären Pumpstromes mit einem passiven Photostrom verursacht. Die Zeitskalierungen sind unterschiedlich gewählt, damit die Peak-Ströme jeweils am besten erkennbar sind. GR-WT und ChR1-T198M würden der Variante A in Abbildung 59 entsprechen. Zusätzlich können reale transiente Peak-Ströme eine Rolle spielen, wodurch CsR-R83Q-M119T erklärbar wäre und der Variante C in Abbildung 59 entsprechen würde.

Interessanterweise stimmt das Muster der Peak-Ströme der Kanalrhodopsin-Mutante ChR1-T198M grundsätzlich mit GR-WT überein. Aus den Beobachtungen an GR-WT und ChR1-T198M kann jedoch noch kein allgemeines Konzept zum Pump-Kanal-Dualismus abgeleitet werden, denn die Stromspuren in anderen untersuchten Konstrukten unterscheiden sich zu GR-WT und ChR1-T198M. So zeigen zum Beispiel die Mutanten von CsR-R83X sowie CsR-Y80D und CsR-Y207H einen anderen Typ des Pump-Kanal-Dualismus. Dies ist besonders gut bei CsR-R83Q-M119T in Abbildung 61C zu sehen. Die Peak-Ströme können hier nur durch einen schnellen realen transienten Peak-Strom des passiven Kanals erklärt werden, wie in Abbildung 59 als Variante C gezeigt wurde. Offenbar gibt es in mikrobiellen Rhodopsinen mehrere kinetische Varianten eines Pump-Kanal-Dualismus.

Das Modell der überlagerten Pump- und Kanalströme aus Abbildung 59 kann zur Erklärung von Peak-Strömen bei einer bestimmten Klasse von Mutanten nicht verwendet werden. Zu dieser Klasse zählen alle Konstrukte, welche unter physiologischen Bedingungen überhaupt keine Pumpaktivität mehr aufweisen und trotzdem ungewöhnliche Peak-Ströme zeigen. Hierzu zählt vor allem CsR-Y57K und CsR-D211N (siehe Abbildung 34B, Abbildung 35D und Abbildung 39). Interessanterweise zeigten diese Mutanten bevorzugt nur auswärts gerichtete stationäre Photoströme („outward rectification“). Erst unter Bedingungen mit einwärts gerichtetem passivem Protonenfluss tauchten die ungewöhnlichen Peak-Ströme zusammen mit schwachen stationären Strömen auf. Diese einwärts gerichteten Peak-Ströme ähnelten Konstrukten, deren primärer Protonenakzeptor mutiert wurde

(Δ BR-D85X, CsR-D86T/N und GR-D121T). Beispiele hierfür sind in Abbildung 62 gezeigt. Tatsächlich würden die beobachteten Peak-Ströme am besten dem Modell in Abbildung 62D entsprechen, bei dem eine Überlagerung aus einem rein passiven Photostrom und transienten Peak-Strömen (verursacht allein durch interne Ladungsverschiebungen) zu sehen ist. Demnach wären CsR-Y57K und CsR-D211N reine passive Protonentransporter, welche bei einwärts gerichteten elektrochemischen Gradienten (negative Spannung oder niedrige pH_o -Werte) zunehmend inaktivieren und stattdessen transiente Peak-Ströme zeigen.

Erst die Kombination von CsR-Y57K mit der R83Q-Mutante kann offenbar diese Inaktivierung verhindern und ermöglicht einen passiven auswärts und einwärts gerichteten Protonentransport, ohne dass ein „outward-“ oder „inward rectification“ zu beobachten ist. Die Unterschiede in den Aktionsspektren zu CsR-Y57K-R83Q (Abbildung 40F) zeigen, dass das „Umschalten“ zwischen passiven Auswärts- und passiven Einwärts-Strömen wahrscheinlich mit einer strukturellen Änderung des Gegenion-Komplexes verknüpft ist. Wahrscheinlich existieren bei diesem Umschalt-Prozess Proteinzustände von CsR-Y57K-R83Q, welche transiente Photoströme allein durch interne Ladungsverschiebungen hervorrufen (Abbildungen 62C und D). Dies würde auch erklären, warum die Stromamplituden von CsR-Y57K-R83Q bei $\text{pH}_o=7.5$ auch bei hohen Spannungen sehr schwach im Vergleich zu anderen pH_o -Werten sind (Abbildung 40A).

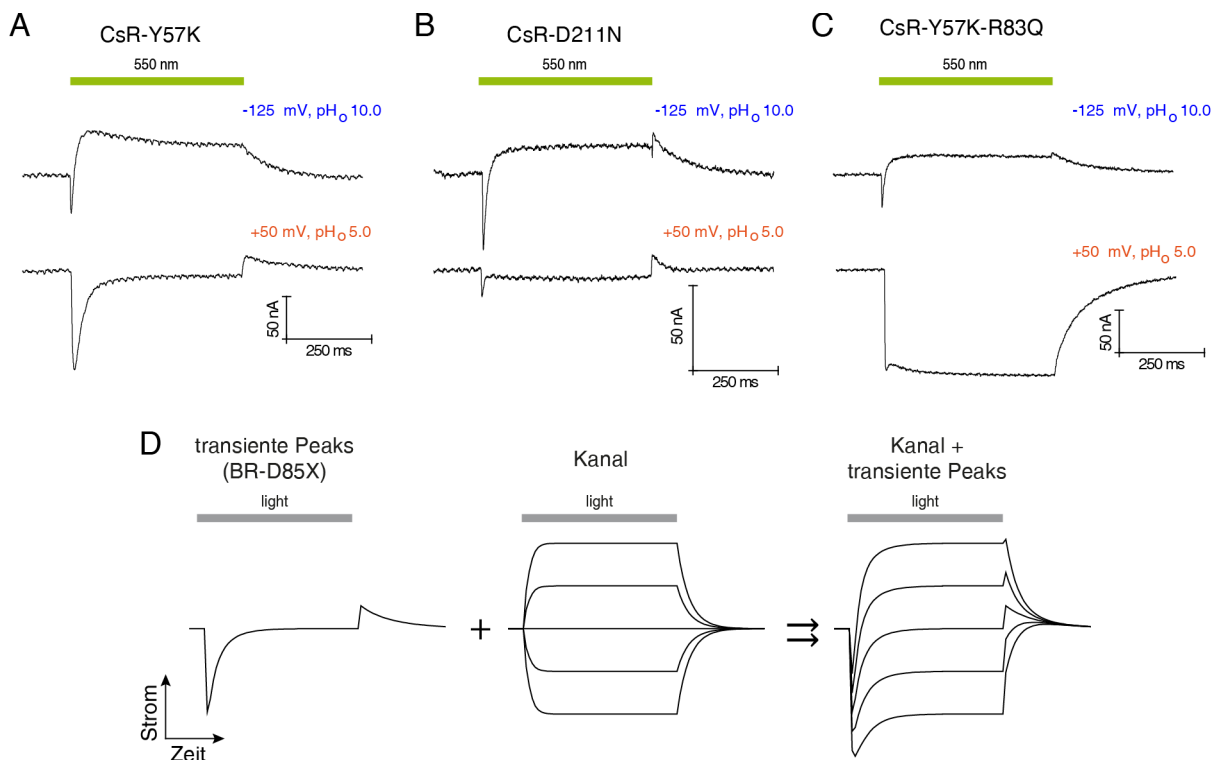


Abbildung 62: Modell der Überlagerung von passiven stationären Photoströmen mit transienten Photoströmen. Die transienten Photoströme resultieren allein aus internen Ladungsverschiebungen ohne Netto-Protonentransport über die gesamte Membran. A-C: Beispiele aus den experimentellen Daten von Stromspuren in der Nähe der Umkehrpotentiale. Die gezeigten Konstrukte zeigen keine Pumpaktivität, weswegen hier auch kein Pump-Kanal-Dualismus mehr vorliegt. D: Modell zur Erklärung der transienten Peak-Ströme bei den gezeigten experimentellen Beispielen (vgl. Abbildung 59). Durch Variation der Amplituden, Kinetiken und der prozentualen Verteilung aus „Kanalmodus“ und „inaktivierten Modus“ wären weitere Varianten vorstellbar.

Interessanterweise wurden für ChR2 in HEK293-Zellen ($\text{pH}_{i/o}=9.0$) die gleichen Photoströme wie bei den CsR-Mutanten in Abbildung 62 (Oozyten, $\text{pH}_o=10$) beobachtet, siehe hierfür Abbildung 3 in der Publikation von Schneider *et al.* [44]. Für ChR2 wurde als Ursache für die entgegengesetzten Peak-

Ströme die Theorie vorgeschlagen, dass unterschiedliche leitende offene Zustände vorliegen. Es wäre jedoch für ChR2 und bei anderen Kanalrhodopsinen vorstellbar, dass die transienten Peak-Ströme ebenfalls, wie bei den CsR-Mutanten, durch Photozyklus-Seitenwege mit intramolekularen Ladungsverschiebungen verursacht werden.

Zusammengefasst lassen sich die experimentellen Daten zu den Umkehrpotentialen mit der Theorie über die Überlagerung von passiven Strömen, aktiven Pumpströmen und Zuständen ohne stationäre Ströme (reale transiente Peak-Ströme/Inaktivierung) in Einklang bringen. Abbildung 63 zeigt eine Zusammenfassung verschiedenster Arten an beobachteten Umkehrpotentialen. Im Folgenden werden die einzelnen Varianten zur Übersichtlichkeit in Klassen eingeteilt und vorgestellt:

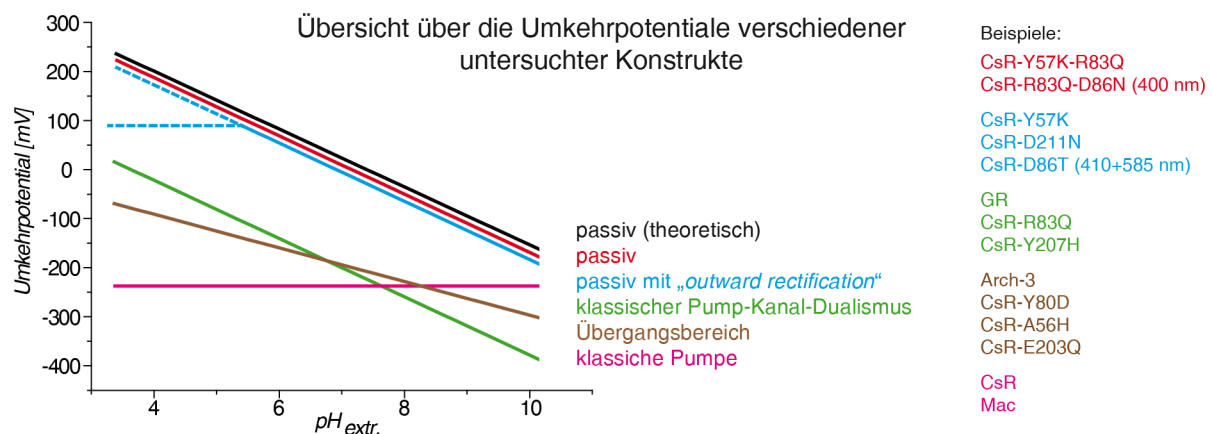


Abbildung 63: Eingruppierung der experimentell bestimmten Umkehrpotentiale in verschiedene Klassen. Bei den Konstrukten mit passiven stationären Photoströmen mit „outward rectification“ (blaue Linie) besteht aufgrund niedriger Stromamplituden eine große Messungenauigkeit im sauren pH_o -Bereich (blau gestrichelt).

Passive Transporter: Das Merkmal dieser Klasse ist, dass keine Pumpaktivität mehr vorliegt. In diese Klasse gehören zum Beispiel die Konstrukte CsR-Y57K, CsR-D211N, CsR-Y57K-R83Q und CsR-R83Q-D86N (mit Blaulicht). Dabei lassen sich diese Konstrukte weiter unterteilen, weil sich der dahinterliegende Mechanismus wahrscheinlich jeweils unterscheidet:

1. So sind CsR-Y57K und CsR-D211N auswärts gerichtete passive Protonentransporter, welche bei niedrigen pH_o -Werten inaktivieren („outward rectification“). Die Umkehrpotentiale werden durch die Inaktivierung selber nicht beeinflusst, jedoch erschweren die reduzierten Amplituden eine zuverlässige Bestimmung der Umkehrpotentiale bei niedrigen pH_o -Werten (gekennzeichnet durch die blauen gestrichelten Linien).
2. Die Doppelmutante CsR-R83Q-D86N zeigt passive einwärts gerichtete Ströme bei grünem Licht und passive auswärts gerichtete Ströme mit Blaulicht (Abbildung 40). Nur die Umkehrpotentiale der mit Blaulicht induzierten Photoströme konnten zuverlässig bestimmt werden, weswegen nur diese gezeigt sind. Konstrukte mit residualer Pumpaktivität müssen offenbar erst mit der Mutation CsR-D86X kombiniert werden, um die residuale Pumpaktivität völlig auszuschalten.
3. Bei CsR-D86T führte erst die Belichtung mit Blaulicht zusammen mit grünem Licht zu rein passivem Transport (Abbildung 33).
4. Zudem lassen sich die passiven Transporter unabhängig von ihren Umkehrpotentialen wahrscheinlich in weitere Varianten unterteilen, welche entweder nur ein oder mehrere Protonen pro Photozyklus passiv transportieren.

Transporter mit Pump-Kanal-Dualismus: In diese Klasse gehören Konstrukte wie GR-WT, CsR-R83Q und auch die Kanalrhodopsin-Mutante ChR1-T198M. Die PMF war bei allen pH_o -Werten weitestgehend konstant, wobei die Pumpaktivität immer in einem auswärts gerichteten Protonen-Transport bestand. Bei den Rhodopsinen mit Pump-Kanal-Dualismus gibt es wahrscheinlich Varianten (wie bei den rein passiven Transportern), welche immer nur ein Proton passiv pro Photozyklus leiten und andere, welche mehrere Protonen pro Photozyklus transportieren (falls ein Gradient anliegt). Besonders bei CsR-R83Q-M119T und CsR-R83Q-W182F in Abbildung 42 ist davon auszugehen, dass mehrere Protonen pro Photozyklus passiv transportiert werden, weil die stationären Stromamplituden über 2000 nA groß sind und dies trotz langsamer Photozyklus-Kinetik.

Übergangsbereich: In diese Klasse gehören Mutanten wie CsR-A56H und CsR-Y80D, aber auch Arch-3-WT. Die Vertreter dieser Klasse zeigen ebenfalls eine Form des Pump-Kanal-Dualismus, jedoch ist die PMF vom pH_o -Wert abhängig. Zudem sind die einwärts gerichteten Photoströme teils erst bei sehr hohen elektrochemischen Gradienten sichtbar (Arch3-WT und CsR-E203Q).

Klassische Pumpen: Die Hauptvertreter dieser Klasse sind CsR-WT, BR-WT und Mac-WT. Sie sind Pumpen, welche aktiv Protonen von innen nach außen pumpen. Ihre PMF steigt bei sinkenden extrazellulären pH-Werten. Im gesamten Messbereich konnten keine einwärts gerichteten Photoströme beobachtet werden. Daher mussten die Umkehrpotentiale immer extrapoliert werden. Ihre Photoströme inaktivieren offenbar bei hohen elektrochemischen Gradienten sehr effizient, wenn diese der Pumprichtung entgegengesetzt sind.

3.2 Vergleich von Pumpen mit Kanalrhodopsinen

Die bisherige Diskussion betrachtete die untersuchten Konstrukte als Gesamtsysteme. Die Frage nach den molekularen Grundlagen für die funktionalen Unterschiede der untersuchten Konstrukte wurde bisher nicht angetastet. Mit Hilfe der Mutationsanalysen konnten sehr gute Einblicke in die wichtigsten Strukturbereiche gewonnen werden, welche im Folgenden einzeln betrachtet werden. Aufgrund der Fülle an verschiedenen untersuchten Konstrukten und Mutanten werden nur ausgewählte Positionen näher diskutiert.

3.2.1 Intrazellulärer Halbkanal von Protonenpumpen und Kanälen

Der intrazelluläre Halbkanal öffnet sich sowohl in den Protonenpumpen als auch in den Kanalrhodopsinen erst relativ spät während des Photozyklus [21, 22, 76]. Allerdings muss sich der extrazelluläre Halbkanal in Protonenpumpen erst schließen, bevor sich der intrazelluläre Halbkanal öffnen kann. Dagegen benötigen Kanalrhodopsine eine Struktur, welche die passive Leitung sowohl von Protonen als auch von anderen Ionenarten erlaubt. Abbildung 64 zeigt eine Gegenüberstellung der Kristall-Strukturen von BR und C1C2 mit geschlossenem Halbkanal. Für Kanalrhodopsine ist die Struktur des offenen Kanals weiterhin unbekannt. Im Falle der Protonenpumpen formen die intramolekularen Wassermoleküle eine durchgehende Wasserkette zwischen dem BR-D96 und der Schiff-Base beim Übergang vom M- zum N-Intermediat [21]. Für Kanalrhodopsine ist ein Mechanismus anzunehmen, bei dem sich eine durchgehende Passage für Ionen durch das gesamte Protein bildet.

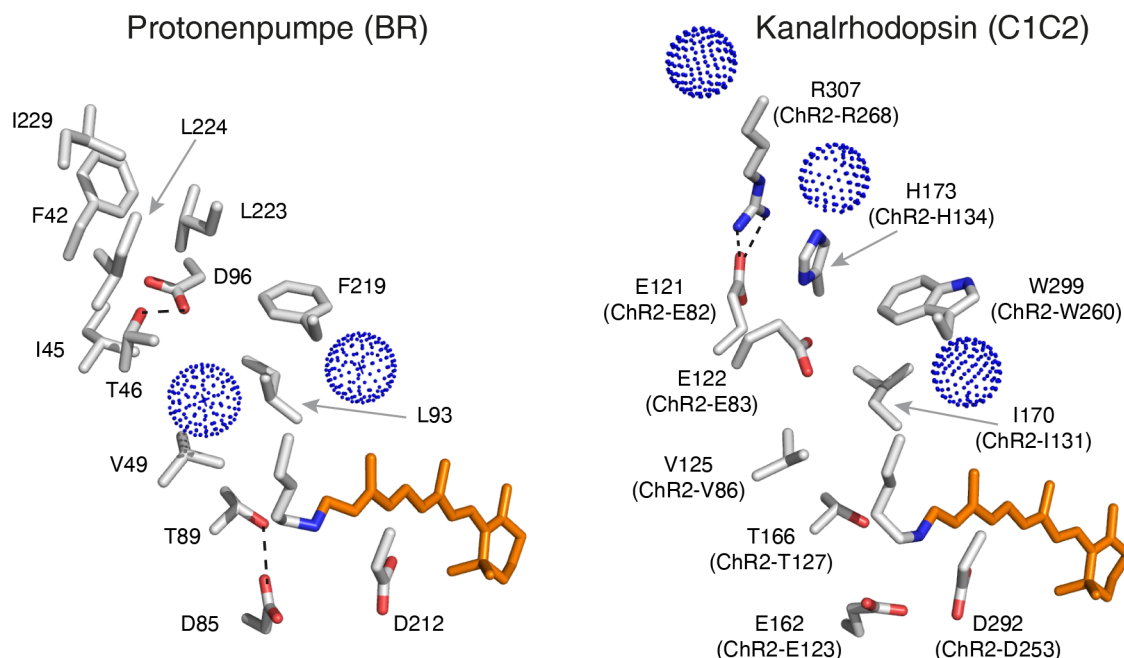


Abbildung 64: Vergleich des intrazellulären Halbkanals der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9). Bekannte Positionen von intramolekularem Wasser sind als blaue Sphären gezeigt. Die gestrichelten Linien zeigen bekannte Wasserstoffbrückenbindungen.

Beim Vergleich der Strukturen fällt auf, dass die Struktur in Protonenpumpen grundsätzlich hydrophober als in C1C2 ist. In Bakteriorhodopsin und anderen Protonenpumpen verleihen nur der Protonendonator D96 zusammen mit T46 und den Wassermolekülen dem intrazellulären Halbkanal polare Eigenschaften. In Kanalrhodopsinen ist die Region um das H173 (ChR2-H134, \triangleq BR-D96)

deutlich polarer als in Protonenpumpen und wird von geladenen Resten flankiert. Interessanterweise unterscheiden sich die Kation-Kanalrhodopsine im Bereich vom H173 bis zur Schiff-Base nur gering von Protonenpumpen, denn die Aminosäuren V49 und L93 in BR sind vergleichbar zu V125 und I170 in C1C2 (in einigen Kanalrhodopsinen ist das C1C2-I170 ebenfalls als ein Leucin kodiert).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass der Protonendonor in Protonenpumpen (BR-D96) elementar für die Pumpfunktion in Protonenpumpen ist. Dieses bisherige Modell zu mikrobiellen Protonenpumpen wurde durch die Existenz der Protonenpumpen aus der Gattung *Exiguobacterium* in Frage gestellt, weil diese ein Lysin an der Position von BR-D96 besitzen [64, 66, 152, 153]. Interessanterweise findet sich im Kanalrhodopsin Chrimson an dieser Position ebenfalls ein Lysin statt eines Histidins wie H134 in ChR2 [98]. Somit sind das Kanalrhodopsin Chrimson und die beiden Protonenpumpen ESR und E17R in dieser Position identisch. Auch die Mutante ChR2-H134D war in früheren Untersuchungen von Berndt *et al.* funktional und zeigte reduzierte einwärts gerichtete Photoströme und Verschiebungen in den Umkehrpotentialen [147]. Es wurden mittlerweile weitere Protonenpumpen von Harris *et al.* entdeckt (siehe ergänzend Abschnitt 1.3.2), welche ein Glycin oder andere ungeladene Reste an der Position von BR-D96 besitzen [67].

In dieser Arbeit konnte erstmals elektrophysiologisch in nativen Zellen gezeigt werden, dass die Protonenpumpe ESR tatsächlich funktional ist und eine Pumpaktivität zeigt (Abbildung 9). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die Mutante GR-E132K (\triangle BR-D96) funktional ist und ebenfalls eine Pumpkraft ausübt (Abbildung 25). Im Falle von GR-E132K konnten sogar die einwärts gerichteten Ströme von GR-WT inhibiert werden. Durch GR-E132D und andere Mutationen in diesem Bereich wurde zwar das Ausmaß der einwärts gerichteten Ströme drastisch reduziert, aber die Pumpkraft wurde ebenfalls reduziert (Abbildung 28A). Untersuchungen von Choi *et al.* zeigten ebenfalls eine geringere Pumpaktivität in GR-E132D und bestätigten die eigenen Ergebnisse [154]. Seltsamerweise verstärkte die Mutation E108D im „Green-Proteorhodopsin“ (\triangle GR-E132D) die einwärts gerichteten Photoströme bei hohen elektrochemischen Gradienten und führte somit zu einem entgegen gesetzten Effekt im Vergleich zu GR [55]. Andererseits zeigte CsR-D97E (\triangle BR-D96) keinen großen Unterschied zu CsR-WT (Abbildung 32).

Bei der Untersuchung der CsR-Mutanten T46N/Q (\triangle BR-T46) wurde eine reduzierte Spannungsabhängigkeit beobachtet (siehe Abbildung 32 und Abbildung 41). Hierdurch erhöhte sich auch die absolute Pumpkraft. CsR-T46N war aufgrund der hohen Pumpkraft und der generell hohen Photostromamplituden von CsR in Oozyten der geeignetste Kandidat, um pH-sensitive ASIC-Kanäle im Rahmen der „two-component optogenetic“ durch lichtabhängige Ansäuerung zu aktivieren [155]. Die Effekte von CsR-T46N/Q konnten jedoch nicht in äquivalenten Mutanten anderer Protonenpumpen beobachtet werden (zumindest wurde dies in BR und Arch-3 getestet, nicht gezeigt).

Zusammengefasst ist die strukturelle Ähnlichkeit des intrazellulären Halbkanales von Protonenpumpen und Kanalrhodopsinen allgemein größer, als es die alleinige Betrachtung von BR und C1C2 erwarten lassen würde. Daher ist die Region um den primären Protonendonor als nicht entscheidend für die Unterschiede zwischen Pumpen und Kanälen einzustufen. Der intrazelluläre Halbkanal hat jedoch durchaus modulierende Einflüsse auf die Pumpaktivität.

3.2.2 Gegenion-Komplex und benachbarte Positionen bei Protonenpumpen und Kanälen

Sowohl in Protonenpumpen als auch in Kanalrhodopsinen wird die protonierte Schiff-Base meistens direkt von zwei sauren Resten (D85 und D212 in BR) und mindestens einem Wassermolekül flankiert, welche die Protonierung der Schiff-Base stabilisieren. Abbildung 65 zeigt den Vergleich des Gegenion-Komplexes von BR mit C1C2.

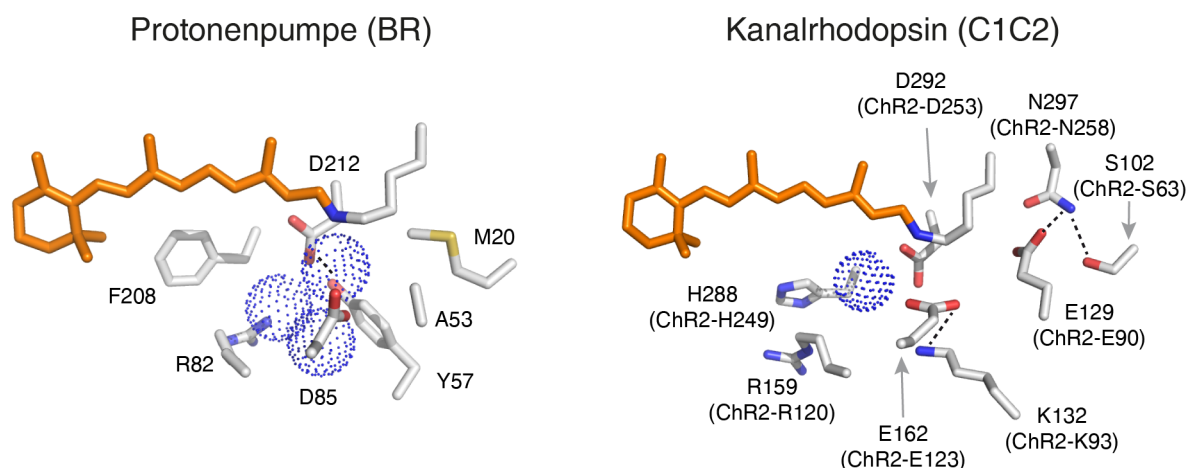


Abbildung 65: Vergleich des Gegenion-Komplexes der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9). Bekannte Positionen von intramolekularem Wasser sind als blaue Sphären gezeigt. Die gestrichelten Linien zeigen bekannte Wasserstoffbrückenbindungen.

Ein wichtiger bekannter Unterschied zwischen den Protonenpumpen und Kanälen besteht in der Bedeutung der Aspartate bzw. Glutamate unmittelbar an der protonierten Schiff-Base. In Protonenpumpen dient das D85 als primärer Protonenakzeptor, während in den Kanalrhodopsinen das C1C2-D292 (\triangleq BR-D212, \triangleq ChR2-D253) diese Aufgabe übernimmt [76]. Zumindest führen Mutationen in C1C2-D292X zu einer sehr starken Reduzierung der Photostromamplituden, während die Mutante C1C2-E162A (\triangleq BR-D85, \triangleq ChR2-E132) lediglich leicht reduzierte Photoströme und schnellere Kinetiken aufweist [76, 95]. Zwar ist damit die Funktionalität der Aspartate/Glutamate zwischen Pumpen und Kanälen offenbar verschieden, aber das grundlegende strukturelle Arrangement ist konserviert.

In den eigenen Experimenten an GR und CsR zeigte sich in den Mutanten CsR-D86T/N und GR-D121T (\triangleq BR-D85) ganz klar, dass der primäre Protonenakzeptor im Einklang mit der BR-Literatur essenziell für aktiven Protonentransport ist. Ebenfalls konnte elektrophysiologisch bestätigt werden, dass ein pH-abhängiges Gleichgewicht bei CsR-D86T bereits unter physiologischen Bedingungen zwischen einer protonierten und deprotonierten Schiff-Base in Mutanten mit neutralisiertem Protonenakzeptor existiert [156, 157].

In der Literatur zu Protonenpumpen mit mutierten primären Protonenakzeptor wurde von einer Inversion der Pumpströme berichtet [55, 158]. Für CsR-D86T/N und GR-D121T konnte jedoch kein eindeutiger aktiver Ionentransport bei Belichtung festgestellt werden. Zwar wurde für CsR-D86T bei Belichtung nur mit blauem Licht ein sehr schwacher Pumpstrom beobachtet (Abbildung 33), jedoch ist es aufgrund der sehr kleinen Stromamplituden wahrscheinlich, dass es sich um ein Artefakt handelte. Alle Ströme von CsR-D86T/N und GR-D121T waren entweder transiente Photoströme oder

passive stationäre Ströme. Es ist zu vermuten, dass die stationären Photoströme, welche in BR-D85T/N und GPR-D97T beobachtet wurden, letztendlich auch passive Photoströme sind [55, 158].

In GR spielt der Protonenakzeptor eine wichtige Rolle für die passiven Ströme, da in GR-D121T bei Belichtung mit grünem Licht keine einwärts gerichteten und passiven Ströme beobachtet werden konnten (Abbildung 25). In CsR-R83Q spielte der primäre Protonenakzeptor jedoch keine Rolle für die passiven Ströme, da in der Mutante CsR-R83Q-D86N mit grünem Licht weiterhin einwärts gerichtete passive Ströme beobachtet wurden (Abbildung 40). Das zeigt, dass zwischen GR-WT und CsR-R83Q Unterschiede bestehen, obwohl beide den gleichen Pump-Kanal-Dualismus zeigen (zumindest aus bei Betrachtung der Umkehrpotentiale).

Zum primären Protonenakzeptor in Protonenpumpen lässt sich zusammenfassen, dass dieser essenziell für aktiven Protonentransport ist. Mutationen im gesamten Gegenion-Komplex können passive Photoströme verursachen. Interessanterweise zeigte besonders CsR-D211N ähnlich wie CsR-Y57K passive Ströme mit hohen Stromamplituden (Abbildung 34 und Abbildung 39). Vermutlich spielt CsR-D211 (\triangle BR-D212) eine wichtigere Rolle als der primäre Protonenakzeptor, um Pumpen in passive Transporter umzuwandeln. Der Gegenion-Komplex spielt damit, wie zu erwarten und im Unterschied zum intrazellulären Halbkanal, die entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung eines aktiven Pumpstroms. Die besondere Rolle des primären Protonendonors und indirekt des gesamten Gegenion-Komplexes für die Verhinderung von passiven Strömen wurde prinzipiell auch schon von Lörinczi *et al.* mit der Mutante GPR-D97T erkannt [55]. Die Daten zu GPR-D97T wurden jedoch so interpretiert, dass der Protonierungszustand von GPR-D97T darüber entscheidet, ob GPR aktiv nach innen oder außen pumpt. Es ist anzunehmen, dass GPR-D97T ähnlich wie CsR-D86T passive Ströme und intramolekulare Ladungsverschiebungen zeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in ChR2 ebenfalls Positionen in unmittelbarer Nähe zum Gegenion-Komplex untersucht (siehe Abschnitt 2.5.2). Es wurde vermutet, dass die Positionen N258, S63 und E90 in ChR2 entscheidend für die Kanalstruktur an der Retinal-Schiff-Base in ChR2 sind. Entgegen den Erwartungen zeigten die Mutationen ChR2-S63N/D und N258D vergleichsweise kleine Änderungen (Abbildung 65). Dagegen führte ChR2-E90K zu einer drastischen Änderung und ermöglichte den Transport von Anionen [148]. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Gegenion-Komplex sowohl in Kanälen als auch in Pumpen von zentraler Bedeutung für den Ionentransport ist, denn E90 liegt in Kanalrhodopsinen näher am Gegenion-Komplex als N258 und S63.

3.2.3 Extrazellulärer Halbkanal von Protonenpumpen und Kanälen

Der Übergang vom Proteinbereich des Gegenion-Komplexes zum extrazellulären Halbkanal ist fließend. Besonders die Positionen Y57, R82 und F208 in BR (\triangle K93, R120 und H249 in ChR2) bilden ein Bindeglied zwischen diesen beiden Proteinbereichen. Andererseits separieren diese Positionen die Schiff-Base vom extrazellulären Medium (Abbildung 66). Diese Positionen stehen unmittelbar auch in Wechselwirkung mit D85 und D212 in BR (\triangle E132 und D253 in ChR2).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit legen nahe, dass der Komplex aus diesen genannten Positionen (Gegenion-Komplex und Bindeglieder zum extrazellulären Halbkanal) entscheidend für den Unterschied zwischen Protonenpumpen und passiven Protonentransportern ist. Das genaue Arrangement bestimmt darüber, ob und in welcher Art und Weise aktive Pumpströme und bzw. nur

passive Ströme bei Belichtung zu beobachten sind. Selbstverständlich wirken andere Positionen zusätzlich modulierend ein. Dabei haben die Positionen F208 und R82 in BR offenbar die Aufgabe passive Photoströme während des Photozyklus zu verhindern (CsR-R83Q und CsR-Y207H in Abbildung 35). Dies wird wahrscheinlich durch die Bewegung des R82 während des Photozyklus ermöglicht, welche zum zeitweiligen Verschließen des extrazellulären Halbkanales führt [13, 159]. Störungen in diesen Positionen führen zu mehr oder weniger stark ausgeprägten „leak-Strömen“ zusätzlich zu dem stets vorhandenen aktiven Protonentransport. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in den CsR-Mutanten A56H und Y80D (\triangle M56 und Y79 in BR) ebenfalls passive Ströme zusätzlich zu einem aktiven Transport beobachtet wurden (Abbildung 34 und Abbildung 35).

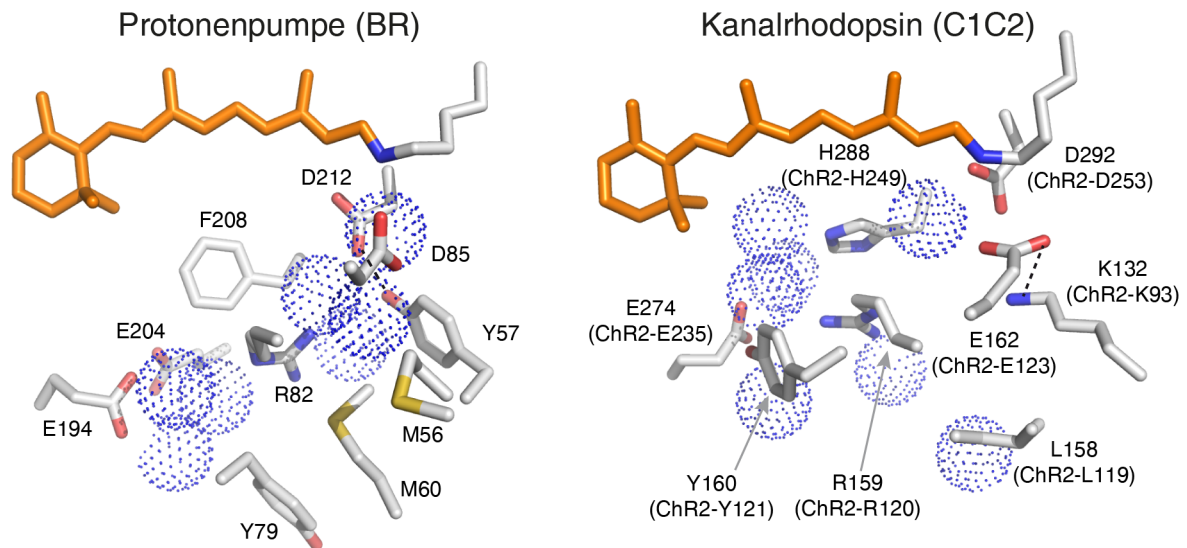


Abbildung 66: Vergleich des extrazellulären Halbkanales der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9). Bekannte Positionen von intramolekularem Wasser sind als blaue Sphären gezeigt. Die gestrichelten Linien zeigen bekannte Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Mutante BR-R82Q wurde bereits in früheren Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen spektroskopisch intensiv untersucht, wobei bisher nicht unter spannungsregulierten und nativen Bedingungen gemessen wurde [160-163]. Die Kernaussagen zu BR-R82Q waren, dass der pK_s -Wert vom primären Protonenakzeptor erhöht und der Zeitpunkt der Abgabe des Protons in den extrazellulären Raum beeinflusst wurde. Dabei entdeckten Stern und Khorana bereits früh, dass BR-R82Q im Vergleich zum WT eine viel stärkere pH-Abhängigkeit in der Protonentransportrate aufweist [164]. Es wurde jedoch nie in den Diskussionen der früheren Arbeiten in Erwägung gezogen, dass diese Mutation zu passiven Strömen bzw. zu einem Pump-Kanal-Dualismus führen könnte.

Interessanterweise ist die Mutante R159A (\triangle BR-R82) im Kanalrhodopsin C1C2 nicht funktional [76]. Andererseits wurden erst kürzlich neue Kation-leitende Kanalrhodopsine von Govorunova *et al.* identifiziert, welche auch ohne ein Arginin an Position BR-R82 funktional sind [165]. Zukünftige Untersuchungen werden hoffentlich sowohl bei den Protonenpumpen als auch bei den Kanalrhodopsinen mehr Klarheit liefern.

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob und in wie weit die Literatur zu BR überhaupt für andere Protonenpumpen verwendet werden kann. BR-R82Q zeigte in dieser Arbeit zwar passive einwärts gerichtete Ströme (Abbildung 43), jedoch waren diese qualitativ und quantitativ verschieden im Vergleich zu CsR-R83Q oder Mac-R136Q (Abbildung 35 und Abbildung 45).

Im Gegensatz zu CsR-R83Q vs. BR-R82Q waren die Effekte bei CsR-Y57K vs. BR-Y57K identisch. Sowohl in CsR-Y57K als auch in BR-Y57K konnten ausgeprägte, passive und auswärts gerichtete Photoströme beobachtet werden (Abbildung 36 und Abbildung 43). Trotz umfangreicher Recherche konnte keine Literatur über die Mutante BR-Y57K gefunden werden. Dafür existiert jedoch Literatur zu BR-Y57N [166]. Die Autoren beobachteten bei BR-Y57N ein langlebiges Photointermediat (≈ 500 ms). Passive Transportvorgänge wurden nicht als Erklärung für ihre Beobachtungen in Betracht gezogen, jedoch konnten diese mit den angewendeten spektroskopischen Methoden auch nicht gemessen werden. BR-Y57N zeigte in den eigenen Experimenten einwärts und auswärts gerichtete Photoströme (Abbildung 43), jedoch war CsR-Y57N elektrophysiologisch komplett inaktiv.

3.2.4 Der Extrazellulärer Halbkanal der Pumpen vom PR-Typ und die Mutante GR-S46D

Wie bereits in Abbildung 24 gezeigt, haben Pumpen vom PR-Typ im Vergleich zum BR-Typ die Besonderheit, dass sie einen extrazellulären Halbkanal aufweisen, welcher den Gegenion-Komplex schwächer nach außen hin abschirmt. Nachdem die Experimente zu GR abgeschlossen waren, wurde jedoch die Struktur des Proteorhodopsins *Med12* aus einem bisher unkultivierten marinen Bakterium gelöst [167]. Diese Struktur zeigt keine „Einbuchtung“ wie XR, aber der extrazelluläre Halbkanal von *Med12* unterscheidet sich trotzdem zu BR. Hierdurch wird eine strukturelle Vielfalt auch innerhalb der Rhodopsine vom PR-Typ erkennbar. Somit sind auch die elektrophysiologischen Unterschiede zwischen GR und dem „Green-Proteorhodopsin“ (GPR) leichter zu verstehen, weil GPR mehr dem *Med12*-Proteorhodopsin entspricht. So waren die einwärts gerichteten Photoströme von GR-WT deutlich ausgeprägter als die von GPR-WT in der Arbeit von Lörinczi *et al.* [55]. Zudem zeigte GR-E132D ein anderes Verhalten als GPR-E108D (siehe Diskussion zu GR-E132X im Abschnitt 3.2.1). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von GR mit XR ist jedoch weiterhin davon auszugehen, dass die Struktur von GR am wahrscheinlichsten der XR-Struktur entspricht. In der nachfolgenden Diskussion sind mit „Pumpen vom PR-Typ“ daher explizit nur XR und GR gemeint.

Bei den Mutationsanalysen zu CsR wurde ausgerechnet der extrazelluläre Halbkanal als kritischer Teil identifiziert, welcher einwärts gerichtete „leak-Ströme“ zusätzlich zu Pumpströmen in Pumpen vom BR-Typ verhindert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Pumpen vom PR-Typ von Natur aus zumindest bei hohen elektrochemischen Gradienten einwärts gerichtete Photoströme zeigen. Als weiteres Merkmal der Pumpen vom PR-Typ kommt hinzu, dass das hoch konservierte Arginin (BR-R82) offenbar von weniger Wassermolekülen flankiert wird und stattdessen Wasserstoffbrückenbindungen direkt mit anderen Resten eingeht. Dies ist am Beispiel der Kristallstruktur von XR in Abbildung 67 gezeigt. Es ist unklar, wie sich diese Wasserverteilung während des Photozyklus ändert, weswegen über die Rolle dieser „fehlenden“ Wassermoleküle nur spekuliert werden kann.

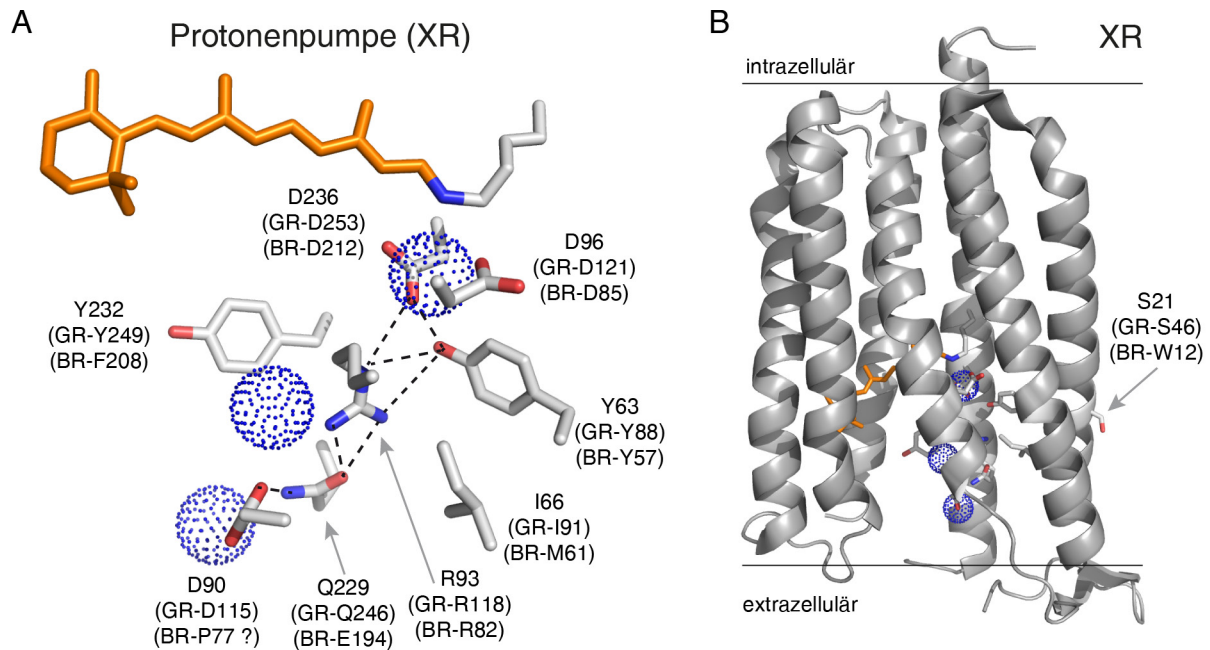


Abbildung 67: Die Kristallstruktur von Xanthorhodopsin (3DDL). A: Extrazellulärer Halbkanal mit bekannten Wasserstoffbrückenbindungen und intramolekularen Wassermolekülen. B: Gesamtansicht von XR mit den Positionen aus Teilabbildung A. Zusätzlich ist die Position XR-S21 gezeigt, welche in GR der Position S46 entspricht. Die Mutante GR-S46D zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die Pumpkraft.

Trotz der Strukturunterschiede zwischen Pumpen vom BR-Typ und PR-Typ führte die Übertragung der CsR-Mutationen R83Q und Y57K auf das *Gloeobacter*-Rhodopsin ebenfalls zu einer deutlichen Abschwächung der Pumpkraft (Abbildung 44), jedoch wurde immer eine Rest-Pumpaktivität in Form eines Pump-Kanal-Dualismus beobachtet. In den GR-Mutanten wurden jedoch nie starke einwärts oder auswärts gerichtete Photoströme über mehrere 1000 nA, wie in einigen CsR-Mutanten, beobachtet. Wahrscheinlich hängt dieser Unterschied zwischen GR und CsR unter anderem aber auch vom intrazellulären Halbkanal ab (siehe Abschnitt 1.3.2). Darüber hinaus sind XR und GR durch Besonderheiten gegenüber anderen Protonenpumpen sowohl vom BR- als auch PR-Typ gekennzeichnet. Hierzu zählt eine stärkere Kopplung der Schiff-Base mit dem primären Proton-Donor [61, 63], welche sicherlich auch den Gegenion-Komplex selbst mit beeinflusst.

An dieser Stelle lohnt sich der Blick auf die ungewöhnliche Mutante GR-S46D, welche von allen GR-Mutanten die geringste Pumpkraft zeigte (Abbildung 27). Diese Mutante ist deswegen ungewöhnlich, weil diese Position in der XR-Kristallstruktur zur Lipid-Doppelschicht zugewandt ist und daher nicht in das Schema der bisherigen Erklärungen passt (Abbildung 67B). Es wäre denkbar, dass die Mutation einen Einfluss auf das Protein über den lokalen Bereich hinaus ausübt und zum Beispiel die Lage und Bewegung der gesamten Helix 1 und der benachbarten Helices beeinflusst.

Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Oligomerisierung von GR durch diese Mutation beeinflusst wird. Dies würde bedeuten, dass die Oligomerisierung einen Einfluss auf den Protonentransport in mikrobiellen Rhodopsinen hätte. Diese Erklärung wird vor allem dadurch gestützt, dass für GR eine pH-abhängige Oligomerisierung nachgewiesen ist [168]. Für das „Green-Proteorhodopsin“ wurde sogar berichtet, dass die Oligomerisierung Einfluss auf den pK_s -Wert des primären Protonenakzeptors hat [169]. Dies würde bedeuten, dass die Oligomerisierung auch eine Rolle beim Pump-Kanal-Dualismus spielen könnte.

3.2.5 Bedeutung der Retinal-Bindetasche für den Ionentransport

Abbildung 68 zeigt die Retinal-Bindetasche von Protonenpumpen im Vergleich zu Kanalrhodopsinen. Von allen bisher betrachteten Proteinbereichen ist die Bindetasche am höchsten zwischen Pumpen und Kanälen konserviert. Kleinere Unterschiede finden sich am β -Ionon-Ring und im so genannten „DC-gate“ [143], welches in ChR2 aus D156 und C128 besteht (\triangle BR-D115 und T90). In BR existiert eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen T90 und D115. Für ChR2 wurde ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zwischen dem C128 und D156 postuliert, wobei diese in der C1C2-Struktur aufgrund des Abstandes zwischen den beiden Resten in Frage gestellt wurde [76, 143].

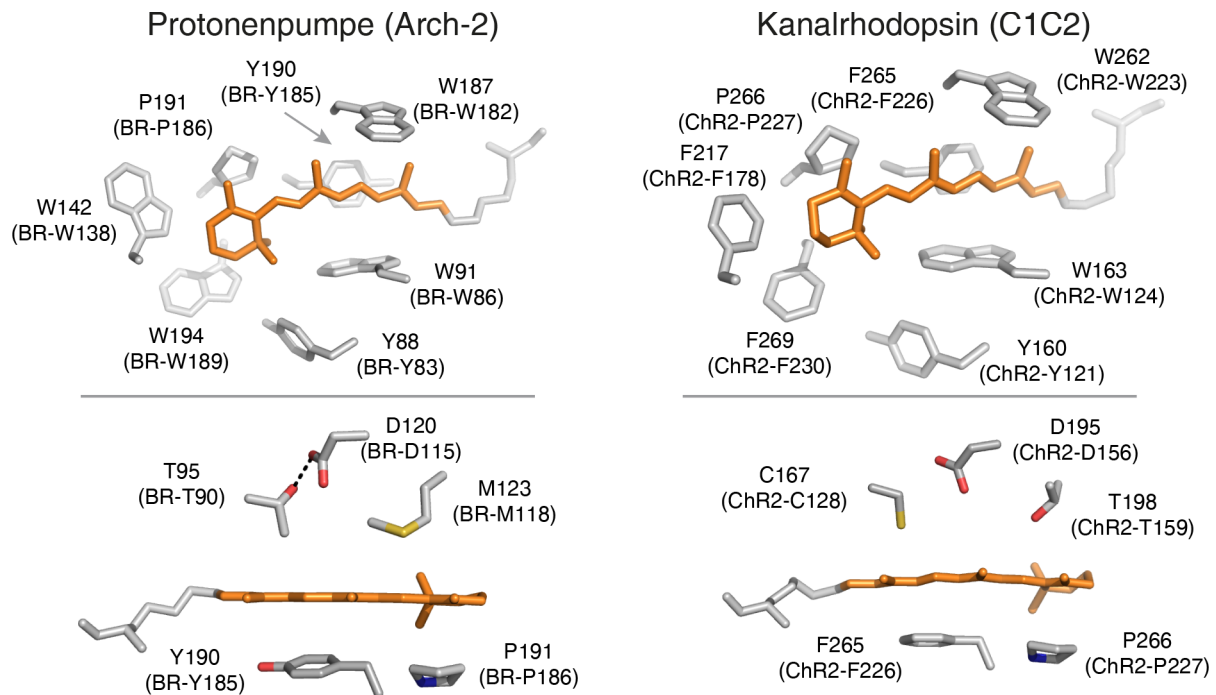


Abbildung 68: Vergleich der Retinal-Bindetaschen der Protonenpumpe Arch-2 (2EI4) und der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2 (3UG9). Gezeigt ist sowohl die Seitenansicht (oberer Teil) als auch die Aufsicht von der intrazellulären Seite hin zum Retinal. Die Retinal-Bindetasche hat auch eine Bedeutung für die Retinal-Analoga-Experimente, welche mit Arch-3 als Pumpe durchgeführt wurden. Daher wurde hier die Kristallstruktur von Arch-2 anstelle von BR gewählt. Eine Struktur von Arch-3 ist bisher nicht gelöst.

Einblicke in die Bedeutung der Retinal-Bindetasche wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Retinal-Analoga und der Mutationen gewonnen. Interessanterweise hatten sowohl die Retinal-Analoga als auch die Mutationen hauptsächlich Einfluss auf die Photozyklus-Kinetik, welche besonders bei den passiven Photoströmen offensichtlich wurde.

Erkenntnisse aus den Retinal-Analoga-Experimenten:

Die wichtigsten Unterschiede zwischen den Protonenpumpen (Arch-3-WT) und den Kanalrhodopsinen (ChR2-WT) waren, dass Arch-3 viel sensibler auf die Analoga reagierte als ChR2. So zeigte Arch-3 entweder überhaupt keine Ströme oder die Verschiebungen waren stets sehr groß und führten nur zu Blauverschiebungen im Aktionsspektrum. Im Vergleich dazu waren die Verschiebungen bei ChR2 gering bis gar nicht vorhanden. Arch-3 war mit den raumfüllenden Retinal-Analoga Trimethoxy- und das Dimethylretinal nicht funktional (Abbildung 57B). Es wird davon ausgegangen, dass das Trimethoxy- und das Dimethylretinal prinzipiell in Arch-3 eingebaut werden, weil in der Kontrolle (kein ATR und kein Analoga) zumindest ein schwacher Photostrom zu messen war, aber nicht in den Experimenten mit dem Trimethoxy- und das Dimethylretinal.

Aufgrund folgender Überlegungen ist es nicht verwunderlich, dass Arch-3 sensibler auf die Retinal-Analoga als ChR2 reagierte: In Pumpen sind im Vergleich zu den Kanälen sperrige Tryptophane am Ring konserviert (W138 und W189 in BR). Es ist daher anzunehmen, dass das Retinal in Pumpen etwas stärker als in Kanälen fixiert ist, wodurch die Retinalbewegungen stärker mit dem Protein gekoppelt sind. Dies ist für Pumpen elementar, weil diese einer strikten und zeitlich versetzten Abfolge an Proteinbewegungen bedürfen, um Pumpaktivität zu realisieren.

Interessant war die Beobachtung, dass die Retinal-Analoga Trimethoxy-, Dimethyl- und das Thiophen-Retinal in Kanalrhodopsinen zu einer drastisch längeren Lebenszeit des leitenden Zustandes führte (Abbildung 54 und Abbildung 55). Der Effekt war vergleichbar zu den ChR2-Mutanten D156A und C128X („*DC-gate*“) aus der Retinal-Bindetasche, welche ebenfalls drastisch verlangsamte Kinetiken zeigten [97, 170, 171]. Es ist daher zu vermuten, dass sowohl die Analoga als auch die Mutationen die Retinal-Bindetasche derart beeinflussen, dass die Rück-Isomerisierung des Retinals verzögert wird.

Erkenntnisse aus den Mutationen an der Retinal-Bindetasche:

In dieser Arbeit wurden in Protonenpumpen die Bindetaschen-Mutanten CsR-W182F, CsR-D115N und CsR-M119T (\triangleq W182, D115 und M118 in BR) getestet. Davon zeigten W182F und M119T ein langlebiges blaues Intermediat, während CsR-D115N unauffällig blieb (Abbildung 38). CsR-W182F und CsR-M119T zeigten auch in Kombination mit der Mutation R83Q den gleichen und hoch interessanten Effekt, dass der offene passiv leitende Zustand verstärkt wurde (Abbildung 42). Die Mutante CsR-D115N blieb in den Experimenten unauffällig (Abbildung 38), jedoch ist dieses Position im Vergleich zu BR-W182 und BR-M118 entfernter zum Retinal (Abbildung 68).

Für ChR2-D156 (\triangleq BR-D115) wird kontrovers diskutiert, ob diese Position als der primäre Protonendonator in Kanalrhodopsinen fungieren könnte [44, 172]. Zumindest in Protonenpumpen spielt das D115 offenbar keine entscheidende funktionale Rolle. Die eigenen Ergebnisse zu den Retinal-Analoga und den CsR-Mutanten (besonders R83Q-W182F) lassen vermuten, dass weitere ChR2-Mutationen an der Retinal-Bindetasche dieselben Effekte hervorrufen würden, welche bereits bei den „*DC-gate*“-Mutanten beobachtet wurden.

Eine besondere Bedeutung haben die Ergebnisse zu der Mutante ChR1-T198M (\triangleq M118 in BR), weil hier ein Kanalrhodopsin in eine Variante mit deutlichem Pump-Kanal-Dualismus umgewandelt wurde (siehe Abschnitt 2.5.1). Bei alleiniger Betrachtung der Mutanten ChR1-T198M und CsR-R83Q-M119T könnte geschlossen werden, dass die Position BR-M118 (\triangleq ChR2-T159, ChR1-T198) eine Schlüsselposition für den Unterschied zwischen Pumpen und Kanälen sein könnte. Die Mutante ChR2-T159M wurde noch nicht intensiv untersucht, jedoch zeigte ChR2-T159C keinen klar erkennbaren Pump-Kanal-Dualismus und führt dagegen zu einer verbesserten Retinal-Bindung und höheren Photostromamplituden [94]. Es ist aber zu vermuten, dass auch in Kanalrhodopsinen weitere Mutationen an der Bindetasche die sehr schwache Pumpaktivität deutlich verstärken könnten. Zum Beispiel wäre die Mutante ChR1-W256F (\triangleq BR-W182) ein vielversprechender Kandidat.

Basierend auf den hier gezeigten und diskutierten Ergebnissen zur Retinal-Bindetasche wird folgende Theorie vorgeschlagen: Mutationen an der Retinal-Bindetasche beeinflussen vor allem die Kinetik der Retinalbewegungen während des Photozyklus durch sterische Einwirkungen. Dadurch lässt sich die Lebenszeit bestimmter Intermediate oder Photozyklus-Wege beeinflussen, wodurch Pumpaktivität oder Kanalaktivität dominieren.

3.3 Abschließende Betrachtung der Modelle

Letztendlich stellt sich weiterhin die Frage, wie das Phänomen des Pump-Kanal-Dualismus nun erklärt werden könnte. Zu Beginn der Diskussion wurden bereits in Abbildung 58 drei vereinfachte Photozyklen aus theoretischen Überlegungen für den Pump-Kanal-Dualismus vorgeschlagen. Die Experimente vor allem zu GR-WT, CsR-R83Q und ChR1-T198M zeigten, dass eine Pumpaktivität auch bei hohen elektrochemischen Gradienten aufrechterhalten wurde (Abbildung 60A und Abbildung 63). Diese Beobachtungen sprechen daher für ein Modell, welches immer eine Pumpaktivität zusätzlich zur passiven Protonenleitfähigkeit gewährleistet. Diese Bedingungen würde bisher das „step by step“-Modell am besten erfüllen.

Die Überlegungen zum Pump-Kanal-Dualismus erfordern eine kritische Betrachtung des Titels der eigenen Publikation „*Gloeobacter Rhodopsin, Limitation of Proton Pumping at High Electrochemical Load*“ aus dem Jahr 2013 [129]. Der Titel kann leicht zu Fehlinterpretationen verleiten, weil die intrinsische Pumpkraft nicht durch den elektrochemischen Gradienten limitiert wird. Bei hohen elektrochemischen Gradienten wird die Pumpkraft dadurch limitiert, dass ein passiver Protonenfluss der aktiven Pumpaktivität entgegen gesetzt ist. Einwärts gerichtete Photoströme sind dann zu beobachten, wenn der einwärts gerichtete passive Protonenfluss die Pumpaktivität dominiert. Bei GR-WT handelt sich demnach um eine „leaky proton pump“. Erst dieser passive „leak“ limitiert die Netto-Pumpkraft bei hohen elektrochemischen Gradienten.

3.3.1 Erweiterung des „step by step“-Modells

Das „step by step“-Modell aus Abbildung 58 stellt nur eine sehr vereinfachte Erklärung für den Pump-Kanal-Dualismus dar. Im Folgenden wird das „step by step“-Modell erweitert, um weitere Beobachtungen aus dieser Arbeit integrieren zu können. Hierbei spielen zwei Beobachtungen eine wichtige Rolle:

1. Bei den Einzelmутanten CsR-M119T und CsR-W182F konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu CsR-WT ein langlebiges blaues Intermediat aufweisen (Abbildung 38). Offenbar ist dieses blaue langlebige Intermediat elementar wichtig für die Lebenszeit des passiv leitenden Zustandes in den Doppelmутanten CsR-R83Q-M119T und CsR-R83Q-W182F, weil hier die Kanalaktivität drastisch gesteigert werden konnte (Abbildung 42). Diese Schlussfolgerung ist natürlich nur unter der Annahme möglich, dass die Effekte der Einzelmутanten R83Q mit M119T bzw. W182F in Kombination unabhängig voneinander bestehen bleiben.
2. Die passiven Photoströme in Konstrukten mit Pump-Kanal-Dualismus waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Unter bestimmten Bedingungen konnten sogar überhaupt keine passiven Photoströme beobachtet werden. Zum Beispiel fehlte bei GR-WT die Spannungsabhängigkeit bei $\text{pH}_0=9.0$ und $\text{pH}_0=10$ komplett (Abbildung 22A). Diese wäre nicht zu erwarten, wenn immer ein passiver Protonentransport zusätzlich zum Pumpstrom existiert. Entweder ist die Lebensdauer des offenen Zustandes sehr pH_0 -abhängig oder der passiv leitende Zustand tritt lediglich als Seitenweg innerhalb des Photozyklus auf.

Abbildung 69 zeigt ein spekulatives Modell, welches die eben genannten Beobachtungen berücksichtigt und auf das bestehende elektrophysiologische Modell für Protonenpumpen aus der Einleitung aufbaut (Abbildung 5). Als Ergänzung zum bestehenden Modell kommt hinzu, dass während des M-Intermediates ein eigener Photozyklus-Teilweg eingeschlagen wird, welcher sowohl einen passiv leitenden Zustand als auch die finalen Pump-Schritte enthält. Das hier gezeigte Modell stellt daher eine Kombination aus dem „step by step“- und dem „branching“-Modell aus Abbildung 58 dar.

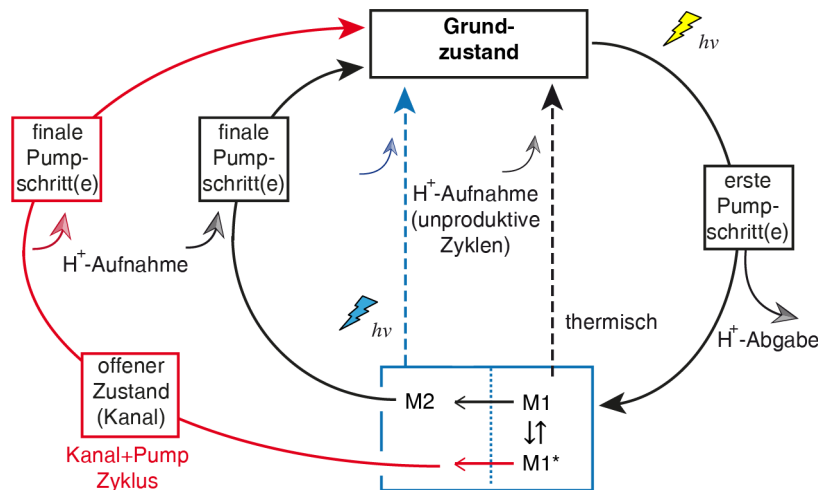


Abbildung 69: Modell zur Erklärung des Pump-Kanal-Dualismus. Darüber hinaus könnte dieses Modell auf Protonenpumpen allgemein übertragen werden. Es wäre dann davon auszugehen, dass Protonenpumpen vom BR-Typ sehr effektiv passive Ströme verhindern, indem das Gleichgewicht sehr auf Seite des reinen Pumpzyklus liegt.

Dieses Modell hat eine bemerkenswerte Eigenschaft, denn es kann neben dem Pump-Kanal-Dualismus auch die verschiedenen Spannungsabhängigkeiten der Protonenpumpen im Allgemeinen erklären. Die Spannungsabhängigkeit von Protonenpumpen würde demnach auch durch passive Transportvorgänge verursacht, welche in dieselbe Richtung wie die Pumprichtung erfolgen. Bei hohen elektrochemischen Gradienten entgegen der Pumprichtung inaktiviert jedoch der Seitenweg mit dem offenen Zustand bzw. das Gleichgewicht zwischen beiden Zyklen verschiebt sich in Richtung des reinen Pumpzyklus. Bei einigen Protonenpumpen funktioniert diese Absicherung gegen „leak-Ströme“ besser als in anderen Protonenpumpen. Daraus könnte die Diversität der Protonenpumpen folgen (siehe Abschnitt 3.4).

Die Grundidee einer Aufspaltung des Photozyklus ist nicht neu, wie zum Beispiel in *figure 12* von Cao *et al.* für BR gezeigt [173]. Auch für GPR wird eine komplexere Aufspaltung des Photozyklus diskutiert, wie dies zum Beispiel in *figure 7* von Tamogami *et al.* gezeigt ist [174]. Dieses Konzept der Aufspaltung wurde hier mit elektrophysiologischem Fokus weiter entwickelt, um die experimentellen Daten aus dieser Arbeit in einem Modell erklären zu können. Die zeitliche Einordnung der Aufspaltung zum „Kanalmodus“ im blauen M-Intermediat basiert allein auf den Experimenten zu CsR-R83Q-M119T, CsR-R83Q-W182F und dem elektrophysiologischen Photozyklus für BR-WT als Ausgangspunkt aus Abbildung 5. Ein direkter Nachweis für die Aufspaltung im M-Intermediat für CsR fehlt. Ein passiv leitender Seitenweg bzw. Zustand könnte daher auch zu einem anderen Zeitpunkt im Photozyklus auftreten.

3.3.2 Erklärung der passiven Protonenströme auf struktureller Ebene

Im Abschnitt 3.2 wurden die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen verschiedenen Protonenpumpen und Kanalrhodopsinen diskutiert. Der Fokus lag auf der Frage, welche Bereiche in Pumpen am kritischsten sind, um passive Ströme zu verhindern bzw. auszulösen. Es zeigte sich, dass der intrazelluläre Halbkanal von geringer Bedeutung ist. Dagegen ist der Gegenion-Komplex entscheidend für aktiven Transport. Der extrazelluläre Halbkanal entscheidet hauptsächlich darüber, ob und in welchem Umfang ein passiver Transport zusätzlich zum aktiven Transport beobachtet werden kann. Wie lassen sich nun die passiven Protonenströme in Form von Photozyklen auf struktureller Ebene erklären?

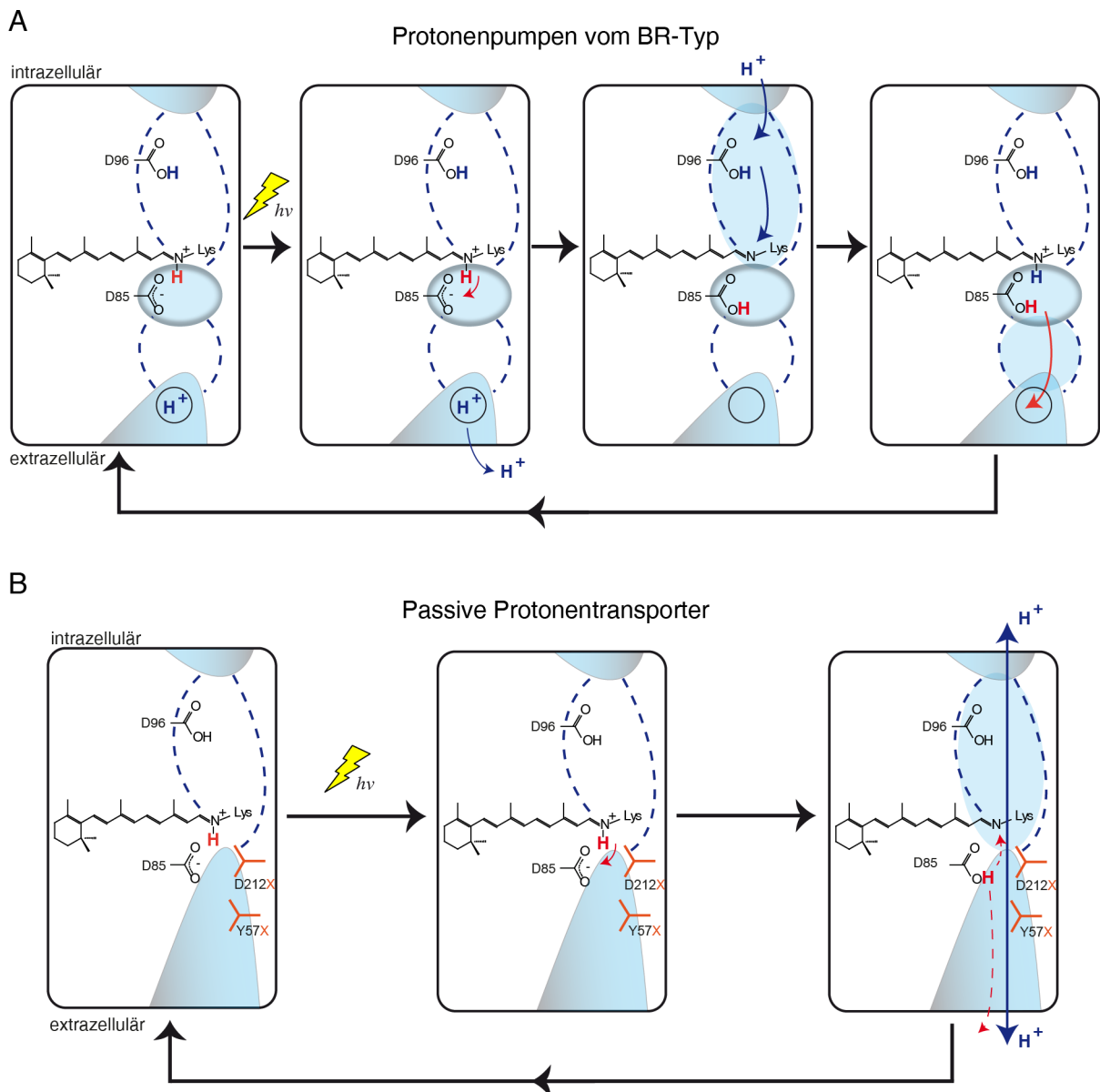


Abbildung 70: Räumlicher Ablauf des Protonentransportes in Protonenpumpen am Beispiel von BR. A: Photozyklus mit aktivem Protonentransport. Einzelne Protonen-Übertragungen erfolgen zeitlich und räumlich getrennt. B: Hypothetischer Photozyklus für einen passiven Protonentransport. Dieser wurde zum Beispiel bei CsR-Y57K oder CsR-D211N beobachtet.

Abbildung 70A zeigt den bekannten Ablauf des aktiven Protonentransports in Protonenpumpen vom BR-Typ. Die Details des klassischen Photozyklus in BR wurden bereits im Abschnitt 1.2 erläutert. Der Grundmechanismus für den aktiven Protonentransport beruht darauf, dass mehrere Protonentransferschritte zeitlich und räumlich getrennt voneinander stattfinden. Dabei sind die einzelnen lokalen Protonentransferschritte durch die pK_s -Werte der beteiligten Gruppen definiert. Die pK_s -Werte müssen sich während des Photozyklus selber ändern, weil jeder Donor zu einem anderen Zeitpunkt auch ein Akzeptor sein muss (und *vice versa*). Wie ist jedoch ein passiver Transport in mutierten Protonenpumpen zu erklären?

In Abbildung 70B wird ein Modell mit einem permanent offenen extrazellulären Halbkanal als Erklärung für das Auftreten von passivem Protonentransport vorgeschlagen. Die Verwandtschaft zu den Modellen für Kanalrhodopsine ist offensichtlich, welche ebenfalls eine offene extrazelluläre Struktur im Grundzustand aufweisen [76]. MD-Simulationen an den Mutanten BR-R82Q und BR-Y57K unterstützen die Theorie, dass bei diesen Mutanten der extrazelluläre Bereich eine offenere Struktur mit mehr Wassermolekülen aufweist [175]. Während des Photozyklus wird dann zusätzlich der intrazelluläre Halbkanal geöffnet und der passive Protonentransport durch das gesamte Protein wird ermöglicht.

Die Erklärung für den Pump-Kanal-Dualismus stellt eine Herausforderung auf struktureller Ebene dar, denn das aktiv transportierte Proton muss sich von dem passiv transportierten Proton(-en) unterscheiden. Die einfachste Überlegung wäre, dass das aktiv zu transportierende Proton während des passiv leitenden Zustandes an einer Aminosäure mit passendem pK_s -Wert „zwischengeparkt“ wird. Erst im späteren Verlauf vom Photozyklus würde dieses Proton weiterbefördert werden. Zusätzlich müssten weitere Protonen „zwischengeparkt“ werden (wie bei BR-WT in Abbildung 70A), um eine Netto-Pumpaktivität zu realisieren. Das Problem an diesem einfachen Modell für den Pump-Kanal-Dualismus ist, dass dieses wahrscheinlich nur in einem begrenzten pH- und Spannungsbereich funktionieren würde. Die Parameter pH-Wert und Spannung haben auch direkt Einfluss auf die einzelnen pK_s -Werte, wie dies zum Beispiel am *Acetabularia*-Rhodopsin diskutiert wurde [42, 176]. Daher würde der aktive Transport ab einem gewissen elektrochemischen Gradienten kollabieren, weil die „zwischengeparkten“ Protonen zunehmend vom Gradienten mitgerissen werden würden bzw. sich die pK_s -Werte durch die Spannung zu stark ändern. Die experimentellen Daten zu GR-WT und anderen Varianten deuteten aber darauf hin, dass die Pumpkraft bei Konstrukten mit Pump-Kanal-Dualismus über einen weiten Bereich vom elektrochemischen Gradienten konstant bleibt.

Eine Lösung für das Problem zur Erklärung des Pump-Kanal-Dualismus könnte sein, dass sich der einwärts gerichtete passive Transport vom auswärts gerichteten passiven Transport auf strukturelle Ebene unterscheidet. Dies trifft wahrscheinlich sowohl auf die Varianten mit Pump-Kanal-Dualismus als auch auf die Konstrukte mit rein passivem Transport zu, denn es gibt bereits erste experimentelle Hinweise auf verschiedene (Grund)-Strukturen: Im Falle der Doppelmutante CsR-Y57K-R83Q mit passiven einwärts und auswärts gerichteten Photoströmen ohne Rest-Pumpaktivität wurden tatsächlich Unterschiede im Aktionsspektrum in einer Größenordnung von 15-20 nm festgestellt (Abbildung 40F). Auch die Einzelmutante CsR-Y57K zeigte kleine Unterschiede im Aktionsspektrum, wie in der Supplement-Abbildung 3 in Vogt *et al.* gezeigt ist [175]. Auch für GR-WT ist eine pH-abhängige Transformation im Absorptionsspektrum vom aufgereinigten Protein bekannt, wobei die Maxima bei $pH \approx 10$ und $pH \approx 5.0$ identisch sind, aber beide sich seltsamerweise von den Maxima bei $pH \approx 7.5$ unterscheiden [154]. Letztendlich bleiben hier Fragen offen und zukünftige Experimente und tiefergehende theoretische Überlegungen könnten hier weitere Einblicke geben.

3.4 Diversität der lichtgetriebenen Protonenpumpen

All diese Entdeckungen, Fragestellungen und Erkenntnisse über passive Photoströme in Pumpen resultierten aus der sorgfältigen Untersuchung der Protonenpumpen. Mit Hilfe der Ergebnisse kann nun die Diversität der Protonenpumpen und deren Verwandtschaft zu den Kanalrhodopsinen besser verstanden werden. Im Folgenden sollen einige Kernfragen zu der Diversität näher diskutiert werden, welche während dieser Arbeit aufgetreten sind:

Woher kommt die Spannungsabhängigkeit? Warum ist die Spannungsabhängigkeit bei den Protonenpumpen verschieden?

Die ungewöhnliche Spannungsabhängigkeit der mikrobiellen Protonenpumpen war schon lange ein Anlass zur Diskussion. Allgemein könnte die Spannung auf verschiedene Arten Einfluss auf ein Ionen-transportierendes Membranprotein ausüben. So könnte die Spannung direkt Einfluss auf die pK_s -Werte haben, auf die Oberflächenladung an der Membran einwirken oder die Bewegung einzelner geladener Reste oder hydratisierter Protonen innerhalb des Proteins beeinflussen. Die eigenen Ergebnisse favorisieren die Theorie, dass die Spannungsabhängigkeit unter anderem durch eine passive Protonenleitfähigkeit verursacht sein könnte. Diese passive Leitfähigkeit ist bei den Pumpen vom BR-Typ womöglich bisher nicht aufgefallen, weil diese bei elektrochemischen Gradienten entgegen der Pumprichtung effizient inaktivieren. Damit könnten die unterschiedlichen Spannungsabhängigkeiten der Protonenpumpen untereinander besser erklärt werden, weil die Inaktivierung der passiven „leak-Ströme“ in den Protonenpumpen verschieden ausgeprägt ist. Selbstverständlich wird die gesamte Spannungsabhängigkeit einer Protonenpumpe letztendlich durch mehrere Faktoren bestimmt.

Warum sind die Stromamplituden der Konstrukte derart verschieden?

Im Abschnitt 2.1.2 ist aufgefallen, dass die Stromamplituden zwischen den Protonenpumpen sehr stark variieren. Zudem zeigten die Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2 in Oozyten bei positiven Haltespannungen im Vergleich zu den Pumpen unerwartet niedrige Stromamplituden. Die nächstliegende Erklärung hierfür sind unterschiedliche Expressionslevel. Die Western-Blot-Experimente in Abbildung 18 zeigten, dass zumindest ChR2-TC im Vergleich zu CsR und Arch-3 tatsächlich schlechter exprimiert. Andererseits deuteten die HEK-Messungen und die Konfokalaufnahmen darauf hin, dass Pumpen und ChR2-WT bei vergleichbarer Expression gleichstarke auswärts gerichtete Ströme zeigen (Abbildung 19 und Abbildung 20). In dieser Arbeit konnten weitere Faktoren identifiziert werden, welche eine Rolle für die verschiedenen Amplituden spielen:

Ein weiterer relevanter Faktor sind offenbar verschiedene endogene Retinale. Die eigenen Ergebnisse sprechen dafür, dass mikrobielle Rhodopsine allgemein mit (3,4)-Didehydroretinal ineffizienter arbeiten als mit Retinal (Abbildung 31 und Abbildung 55). Demnach sollten bei der Anwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik die endogenen Retinal-Derivate bedacht werden. Hinzu kommt, dass der endogene Stoffwechsel von Zellen das Retinal und deren Derivate enzymatisch modifizieren kann, wie dies zum Beispiel für die Umwandlung von Retinol in (3,4)-Didehydroretinol in Keratinozyten bekannt ist [177].

Unter der Annahme, dass die Theorie über die Existenz von natürlichen passiven Protonenströmen in Protonenpumpen stimmt, dann könnten damit Auffälligkeiten in den Photostrom-Amplituden der Pumpen besser erklärt werden. Zum Beispiel könnte diese Theorie erklären, weswegen CsR von den

Protonenpumpen vom BR-Typ die größten Photoströme zeigt. Demnach zeigt CsR im Vergleich zu anderen Pumpen einen höheren Anteil an passiven Protonenströmen, wenn der elektrochemische Gradient den auswärts gerichteten Protonen-Transport begünstigt. Dies würde auch die größte Spannungsabhängigkeit von CsR im Vergleich zu den anderen Pumpen erklären (Abbildung 13). Nebenbei könnten hierdurch auch die hohen Amplituden von CsR gegenüber ChR1 und ChR2 bei positiven Spannungen erklärt werden.

Eine wichtige Rolle für die unterschiedlichen Amplituden könnte auch die Quantenausbeute der Rhodopsine selber und die Quantenausbeute der Fluorophore bei den Konfokalaufnahmen sein. Für Bakteriorhodopsin ist zum Beispiel eine Quantenausbeute von $\phi=0,64$ bekannt, während Halorhodopsin nur $\phi=0,34$ aufweist [178, 179]. Zwar wurden die Quantenausbeuten der Proteine nicht untersucht, jedoch sollte dieser Faktor ebenfalls bedacht werden.

Sicherlich werden in Zukunft systematischere und vor allem vergleichbarere Untersuchungen notwendig sein, um das Wechselspiel zwischen Expression und der funktionalen Effizienz von mikrobiellen Rhodopsinen besser verstehen zu können, vor allem in Hinblick für optogenetische *in vivo* Anwendungen.

Warum gibt es in der Natur die Diversität an Protonenpumpen?

Die einzige sicher bekannte Funktion mikrobieller Protonenpumpen ist der lichtgetriebene Aufbau eines Protonengradienten, um ATP zu produzieren [5]. Daher stellt sich die Frage, warum überhaupt Protonenpumpen wie GR existieren, die einwärts gerichtete Photoströme bei hohen elektrochemischen Gradienten zeigen. Für GR wird angenommen, dass diese Protonenpumpe in *Gloeobacter violaceus* auch zur ATP-Synthese wie in Halobakterien beiträgt [154]. Mit Hilfe der Daten aus dieser Arbeit kann eine These darüber aufgestellt werden, worin der Vorteil von Protonenpumpen wie GR liegen könnte. GR zeigt einen schnellen Photozyklus ohne eine langsame kinetische Komponente, wie dies bei CsR zum Beispiel der Fall ist (Abbildung 29 und Abbildung 31). Daher würde man erwarten, dass GR bei gleicher Expression, Targeting und Quantenausbeute sogar eine höhere Pumpleistung als CsR aufbringen kann. Der Preis dafür ist, dass bei hohen elektrochemischen Gradienten einwärts gerichtete passive Protonenströme auftreten. Die physiologische Umgebung von *Gloeobacter violaceus* ist jedoch basisch, da dieses Cyanobakterium auf Kalkfelsen gefunden wurde [180]. Demnach bedarf GR keinen Schutz gegen saure extrazelluläre pH-Bedingungen. Auch Meerwasser hat einen leicht basischen pH-Wert, weswegen es nicht verwunderlich ist, dass die marinen Proteobakterien Protonenpumpen vom PR-Typ besitzen.

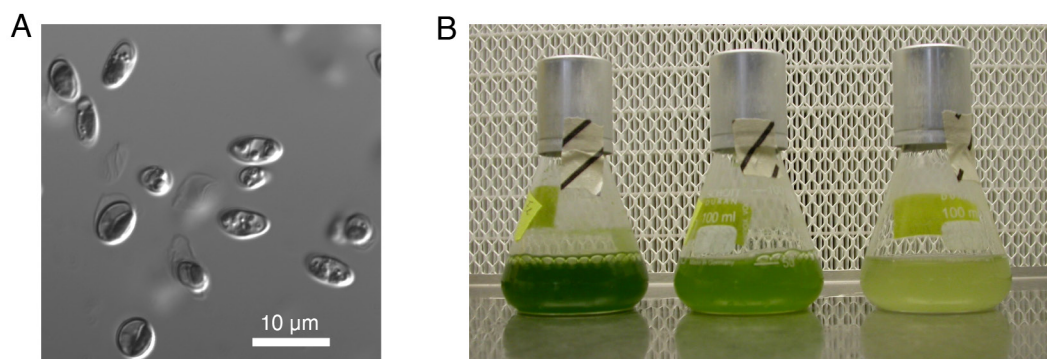


Abbildung 71: Bilder der arktischen Alge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. Die Aufnahmen entstanden im Rahmen weiterer Projekte, um die biologische Funktion der Protonenpumpe CsR zu untersuchen. A: Konfokalaufnahmen. B: Kulturen bei verschiedenen Konzentrationen an Fe-EDTA.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Protonenpumpen ein breites Spektrum an Pumpqualität und -quantität aufweisen, auch unabhängig von den Protonenpumpen vom PR-Typ. Dies lässt vermuten, dass Protonenpumpen in einigen Organismen auch andere Funktionen ausüben könnten. Dafür spricht auch, dass Organismen mit lichtgetriebenen Protonenpumpen bekannt sind, welche im Dunkeln ohne erkennbare Beeinträchtigung wachsen können bzw. auch in kompletter Dunkelheit Protonenpumpen synthetisieren [181-183]. Für einige Protonenpumpen wird vermutet, dass diese in der Nährstoffaufnahme involviert sind oder nur während bestimmter Lebensphasen eine Rolle spielen [49, 184]. Es wäre auch denkbar, dass einige Protonenpumpen in Zusammenarbeit mit Hydrogenasen molekularen Wasserstoff produzieren und in der Stickstofffixierung oder Methanogenese mitwirken [185]. Letztendlich wird deutlich, dass die biologische Rolle der Protonenpumpen ein weites Feld mit vielen offenen Fragen für die Zukunft ist.

3.5 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick für die Rhodopsin-Forschung

In dieser Arbeit wurden zur Übersichtlichkeit die Protonenpumpen in zwei Typen (BR- und PR-Typ) eingeteilt. Zukünftig wird jedoch eine deutlich differenziertere Unterteilung der Protonenpumpen favorisiert, weil die beobachteten Unterschiede zwischen den Wild-Typ Varianten der mikrobiellen Protonenpumpen deutlich größer als erwartet waren. Zudem ist eine erweiterte Unterteilung auch aufgrund neuer Kristallstrukturen und durch die Entdeckung weiterer Protonenpumpen für zukünftige Projekte zu empfehlen.

Übergeordnet konnte aber durch bereits einzelne Mutationen gezeigt werden, dass die lichtgetriebenen Pumpen untereinander und sogar mit den lichtaktivierten Kanalrhodopsine erstaunlich nah verwandt sind. Die Mutation einzelner Positionen in den Rhodopsinen konnte die Pumpkraft variieren, Pumpen in Kanäle umwandeln und die Ionenselektivität ändern. Diese Beobachtungen bieten die Möglichkeit neue Rhodopsine für die angewandte Forschung zu designen. Protonenselektive Kanäle und Protonenpumpen mit spezifischen Eigenschaften bieten viele potentielle Anwendungen in der Neurobiologie, Immunologie, Krebsforschung, Lysozym/Vesikel-Forschung und vielen anderen Bereichen, in welchen pH-Einflüsse oder pH-Gradienten eine Rolle spielen. Zum Beispiel könnten pH-Gradienten an Vesikelmembranen gezielt mit lichtabhängigen aktiven und passiven Protonentransportern moduliert werden. Die Publikation von Rost *et al.* über die Ansäuerung von Lysosomen und synaptischen Vesikeln mit Protonenpumpen zeigt, dass dieses Forschungsfeld Potential aufweist [186]. Zudem könnte die Optimierung weiterer Protonenpumpen für das „*voltage-sensing*“ lohnenswert sein [89], weil sich die intrinsischen Spannungsabhängigkeiten verschiedener Protonenpumpen unterscheidet (Abbildung 13).

Unmittelbar an diese Arbeit drängen sich vielfältige neue Fragestellungen auf. Es wäre sehr interessant den Pump-Kanal-Dualismus unter Bedingungen zu messen, unter denen sowohl die intrazellulären als auch extrazellulären Bedingungen genau kontrolliert werden können. Hierfür würden sich „*Patch-Clamp*“-Messungen von CsR-R83Q-M119T in HEK293-Zellen sehr gut anbieten. HEK293-Messungen würden zudem die Möglichkeit bieten, die Aktionsspektren verschiedener Konstrukte in höherer Qualität bestimmen zu können.

Die Untersuchung von Laser-induzierten Photoströmen von ausgewählten Pumpen und Pump-Kanal-Hybriden würde einen besseren Einblick in den zeitlichen Ablauf der transienten Peak-Ströme und

deren Kinetik ermöglichen. Beispielsweise könnten mit Laser-Messungen die *on*-Kinetiken bei verschiedenen elektrochemischen Bedingungen genau untersucht werden. Es wäre zu erwarten, dass ein „Kanalmodus“ und ein „Pumpmodus“ verschiedene *on*-Kinetiken aufweisen (siehe hierzu z.B. Abbildung 59). In diesem Zusammenhang könnte direkt zwischen realen und scheinbaren transienten Peak-Strömen unterschieden werden, weil die scheinbaren Peak-Ströme (Überlagerung stationärer Photoströme) nur bei Dauerbelichtung auftreten sollten. Zudem könnte die Kombination aus Laser-Messungen und stationärer Belichtung mehr Informationen über die einzelnen Photointermediate liefern. Erste Untersuchungen in diese Richtung wurden bereits am „*Green-Proteorhodopsin*“ durchgeführt, siehe *figure 2* in Lörinczi *et al.* [55], jedoch könnten intensivere Untersuchungen an den in dieser Arbeit untersuchten Rhodopsinen und deren Mutanten lohnenswert sein, weil deren Photostromamplituden deutlich größer als die von GPR sind. Ein ebenfalls sehr vielversprechender Ansatz wäre die Fusion von verschiedenen Konstrukten, um deren absoluten Stromamplituden direkt miteinander stöchiometrisch vergleichen zu können, wie es zum Beispiel für NpHR und ChR2 bereits durchgeführt wurde [187].

Sehr wichtig zum weiteren Verständnis der hier beobachteten Ergebnisse wären spektroskopische Untersuchungen und selbstverständlich Kristallstrukturen verschiedenster CsR-Mutanten, von GR-WT oder auch von ChR1-T198M. In der Diskussion wurden Theorien aufgestellt, welche überprüft beziehungsweise weiterentwickelt werden könnten. Besonders die Theorie, dass Protonenpumpen vom BR-Typ bereits als WT einen passiv leitenden Photozyklus-Seitenweg haben, ist provokativ gegenüber der gängigen Betrachtungsweise über mikrobielle Protonenpumpen. Ein Photozyklus-Seitenweg bzw. ein verzweigter Photozyklus würde jedoch viele Phänomene aus dieser Arbeit erklären. Somit könnten sowohl die Spannungsabhängigkeit, als auch zum Beispiel die Unterschiede zwischen Arch-3 und BR besser erklärt werden (Abbildung 12).

Letztendlich wird die grundlegende Erforschung der mikrobiellen Rhodopsine auch zukünftig ein attraktives Forschungsfeld sein, welches sowohl für die optogenetischen Anwendungen als auch zum allgemeinen Verständnis von Transportprozessen über Membranen relevant ist.

4 Material und Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Gene und Standardvektoren

Die Quellen für die Rhodopsine sind in Tabelle 2 aufgelistet. Neu synthetisierte Gene wurden bei GeneScript (USA) bestellt und enthielten bereits die passenden Schnittstellen für Klonierungen in die Standardvektoren.

Tabelle 2: Auflistung der experimentell untersuchten Rhodopsine und deren Bezugsquellen. Xanthorhodopsin und Actinorhodopsin wurden während dieser Doktorarbeit auch getestet, jedoch konnten von diesen keine Photoströme beobachtet werden.

Name	Abkz.	Organismus	Protein ID	Codon Usage	Bezugs-Quelle/ Kontaktperson
Bakteriorhodopsin	BR	<i>Halobacterium salinarum</i> (Archaea)	P02945	wt	Dr. Satoshi Tsunoda (AG Hegemann)
Halorhodopsin	NpHR	<i>Natronomonas pharaonis</i> (Archaea)	P15647	human	Dr. Satoshi Tsunoda (AG Hegemann)
Green-Proteorhodopsin	GPR	<i>Gamma-proteobacterium EBAC31A08</i> (Bacteria)	Q9F7P4	wt	Prof. T. Friedrich (TU-Berlin, Deutschland)
Archaeorhodopsin-3	Arch-3	<i>Halorubrum sodomense</i> (Archaea)	P96787	human	Dr. Benjamin Rost (Charité, Deutschland)
Gloeobacter-Rhodopsin	GR	<i>Gloeobacter violaceus</i> (Cyanobacteria)	Q7NP59	wt	Prof. Janos K. Lanyi (Irvine, USA)
Coccomyxa-Rhodopsin	CsR	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> (Alge)	I0YUS5	wt	Dr. Satoshi Tsunoda (AG Hegemann)
				human	GeneScript (USA)
Leptosphaeria-Rhodopsin	Mac/LR	<i>Leptosphaeria maculans</i> (Pilz)	Q9HGT7	human	Prof. A. Gottschalk (Uni Frankfurt a.M.)
Exiguobacter-Rhodopsin	ESR	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> (Bacteria)	B1YFV8	human	GeneScript (USA)
Xanthorhodopsin	XR	<i>Salinibacter ruber</i> (Bacteria)	Q2S2F8	wt	Prof. Janos K. Lanyi (Irvine, USA)
Actinorhodopsin	ActR	<i>Actinobacterium SCGC AAA027-L06</i> (Bacteria)	J9H7H8	wt	Dr. Srivastava Abhishek (IGB, Deutschland)
Channelrhodopsin 1	ChR1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Alge)	Q93WP2	wt	Dr. Satoshi Tsunoda (AG Hegemann)
Channelrhodopsin 2	ChR2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Alge)	Q8RUT8	human	Dr. Franziska Schneider (AG Hegemann)
				wt	Dr. Satoshi Tsunoda (AG Hegemann)

Für die heterologe Expression der Rhodopsine in Oozyten wurde *in vitro* cap-RNA synthetisiert. Hierfür diente der Vektor pGEMHE als „DNA-template“. Dieser enthält ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker und die Expressionskassette, welche in Abbildung 72 gezeigt ist. Die Expressionskassette besteht aus einem T7-Promotor für die T7-RNA-Polymerase und der codierenden DNA-

Sequenz für das jeweilige Rhodopsin inklusive Start- und Stoppcodon. Direkt vor und hinter der Rhodopsin-Sequenz befinden sich untranslatierte Bereiche (5'-UTR und 3'-UTR), welche aus dem Gen für das β -Globin aus *Xenopus laevis* stammen [188]. Die *NheI*-Schnittstelle diente zur Linearisierung der DNA, um überlange RNA-Transkripte zu verhindern. Einige Konstrukte enthielten am C-Terminus zusätzlich einen Myc-tag für Western-Blotting.

Der Standard-Vektor für die Transfektion von HEK293-Zellen enthält eine Kanamycin-Resistenz. Die Expression der Rhodopsine wird über den CMV-Promotor initiiert. Zur Identifikation von erfolgreich transfizierten HEK293-Zellen wurden die Rhodopsine über einen Abstandhalter („Spacer“, 30 bp) mit einem Fluorophor (EGFP bzw. ECFP) fusioniert.

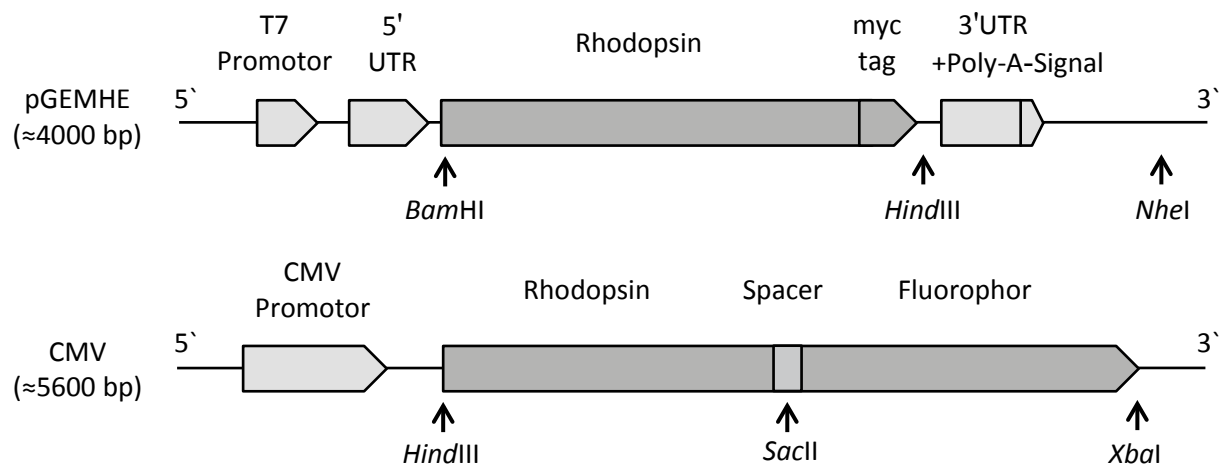


Abbildung 72: Expressionskassetten im pGEMHE- und CMV-Vektor. Die Größen der Vektoren sind für ein typisches Rhodopsin mit 300 AS angegeben. Die grafischen Größenverhältnisse sind nur schematisch.

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten Plasmid-DNA, PCR-Produkte, Klonierungszwischenschritte und cap-RNA wurden über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Hierzu wurden 1 % Gele (w/v) mit TAE-Puffer (Tabelle 7) als Gel- und Lauf-Puffer verwendet (120 V, 15-20 min). Die Gele enthielten Ethidiumbromid zur Visualisierung mit UV-Licht. Es wurden circa 0,5-1 μ g DNA bzw. RNA zusammen mit 10x FD-Green-Buffer (Thermo Scientific, USA) pro Tasche aufgetragen.

4.1.3 Klonierung, PCR, Restriktionsverdau und Ligation

Die Klonierungen erfolgten über die Standardrestriktionsschnittstellen, welche direkt vor und hinter den codierenden DNA-Sequenzen positioniert waren. Bei Bedarf wurden Schnittstellen über PCR eingeführt (siehe Tabelle 3). Die Primer für die PCR-Reaktionen wurden über die SMB GmbH (Deutschland, Berlin) oder IDT (Integrated DNA Technologies, USA) bestellt. Die Primer enthielten einen überhängenden Bereich mit den gewünschten Schnittstellen.

Das PCR-Produkt wurde mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit (MACHEREY-NAGEL, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt und in 15 μ l Elutions-Puffer eluiert. Die Qualität und Größe wurde per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Tabelle 3: Pipettierschema und das Protokoll für die Standard-Klonierungs-PCR. Der Puffer und die Polymerase stammten von Genaxxon (Deutschland). Die dNTPs wurden über Thermo Scientific (USA) bezogen.

PCR-Bestandteile:	Volumina	1.	95 °C	5 min
H ₂ O (add 50 µl)	32 µl	2.	94 °C	30 sec
10xReproFast Buffer	5 µl	3.	60 °C	30 sec
fw/bw-Primer (3 µM Stammlsg.)	5 µl	4.	72 °C	3 min 35x Wdh.
template-DNA (2 ng/µl Stammlsg.)	2 µl	5.	94 °C	30 sec
dNTP (2 mM Stammlsg.)	5 µl	6.	72 °C	10 min
ReproFast Polymerase	1 µl (=5 U)	7.	4 °C	non-stop

Für den Restriktionsverdau wurde der Ausgangsvektor bzw. das PCR-Produkt („insert“) und der Zielvektor jeweils mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für 1 h bei 37 °C inkubiert (3 µg DNA, 3 µl 10xFD-Buffer, je 1 µl Restriktionsenzym, mit H₂O auf 30 µl). Anschließend wurde das gesamte PCR-Produkt auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und ebenfalls mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit (MACHEREY-NAGEL, Deutschland) gereinigt. Die Qualität und Größe wurde wieder per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Alle Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer wurden über Thermo Scientific (USA) bezogen.

Darauf folgte die Ligation mit dem „RapidDNA Dephos & Ligation“-Kit (Roche, Schweiz) entsprechend der Herstellerangaben. Zuvor wurde der Leervektor dephosphoryliert, um eine Selbst-Ligation zu verhindern. Die Ligation des „inserts“ mit dem Leerplasmid erfolgte mit der T4-Ligase (Thermo Scientific, USA). Zuletzt erfolgte die Transformation in kompetente Zellen zur Vervielfältigung der Plasmide (siehe nächsten Abschnitt 4.1.4).

4.1.4 Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmide

Die DNA der mikrobiellen Rhodopsine wurde mit Hilfe von Plasmiden mittels Transformation von *E.coli*-Zellen vervielfältigt. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension von kompetenten XL1-Blue Zellen (Stratagene, USA) mit 0,5 ng vom jeweiligen Plasmid vermischt und 10 min auf Eis kaltgestellt. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden 300 µl LB-Medium (Tabelle 7, ohne Antibiotikum) hinzugegeben und im Thermomixer inkubiert (600 rpm, 45 min und 37 °C). Die Zellsuspension wurde in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und $\frac{3}{4}$ vom Überstand wurden verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und auf LB-Platten (Tabelle 7, mit Antibiotikum) ausplattiert. Die Platten wurden im Tischinkubator über Nacht inkubiert (15-20 h, 37 °C). Anschließend wurden Einzelkolonien gepickt und in je 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tabelle 7) als Selektionsmarker im Tischinkubator geschüttelt (14-16 h, 180 rpm, 37 °C).

Die Plasmide wurden anschließend aus den 4 ml *E.coli*-Kulturen mit dem „NucleoSpin Plasmid“-Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt und die Größe und Reinheit per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Zur Kontrolle der Nukleotidsequenz wurden die Plasmide sequenziert (LGC Genomics, Deutschland).

4.1.5 Ortsspezifische Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen

Zur Einführung von Einzel- oder Mehrfachmutationen wurde das „QuikChange-Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent Technologies, USA) verwendet. Dieses Kit basiert auf der vollständigen Vervielfältigung des Plasmids mit Hilfe der PCR unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Agilent Technologies, USA). Die Durchführung und das PCR-Protokoll entsprachen den Hersteller-Empfehlungen. Hierfür wurden jeweils 20-30 bp lange Primer synthetisiert, welche die gewünschten Mutationen enthielten. Die Primer wurden über die SMB GmbH (Deutschland, Berlin) oder IDT (Integrated DNA Technologies, USA) bestellt. Das PCR-Produkt wurde per Gelelektrophorese verifiziert und mit *DpnI* (Agilent Technologies, USA) verdaut, um parentale DNA zu eliminieren. Zuletzt erfolgte die Transformation von XL1-Blue Zellen (siehe Abschnitt 4.1.4).

4.1.6 Synthese von RNA für die Injektion in Oozyten

Zuerst wurde der pGEMHE-Vektor mit dem jeweiligen Konstrukt mit dem Restriktionsenzym *NheI* (Thermo Scientific, USA) linearisiert. Der Restriktionsverdau und die Aufreinigung erfolgten wie bereits angegeben (siehe Abschnitt 4.1.3), wobei der Reaktionsansatz ohne Gelaufftrennung direkt mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit aufgereinigt wurde. Die Bakteriorhodopsin-Konstrukte wurden mit dem Enzym *NdeI* (Thermo Scientific, USA) linearisiert, weil die DNA-Sequenz für Bakteriorhodopsin eine *NheI*-Schnittstelle enthielt. Die linearisierte DNA wurde per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Die linearisierte DNA diente als „*template*“ für die *in vitro* Transkription zur Herstellung von cap-RNA mit dem „mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit“ (Life Technologies, USA). Dies erfolgte abweichend zu den Herstellerangaben nach folgendem Pipettierschema: 1.5 µl 10xReaction Buffer, 5 µl 2x NTP/CAP, 0.5 µg linearisierte DNA (maximal 3.5 µl), 1 µl Enzyme Mix, ergänzt mit H₂O auf 15 µl. Der Reaktionsansatz wurde für 1:20-1:40 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 10 µl H₂O und 18 µl LiCl vermischt und bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Anschließend wurde die RNA bei 4 °C für 40 min bei 13.000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet in 70 % eisgekühlten Ethanol (100 µl) gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in einem Vakuumkonzentrator getrocknet, um das Ethanol komplett zu entfernen. Das Pellet wurde in 5-15 µl H₂O je nach Pelletgröße gelöst und bei -80 °C bis zur Injektion gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

4.1.7 Western Blotting von Membranfraktionen aus Oozyten

Zum Vergleich der Proteinexpression und des Targetings in Oozyten wurden Western-Blots angefertigt. Hierfür wurden Oozyten verwendet, welche genau 4 Tage vorher injiziert wurden. Die verwendeten Konstrukte waren alle am C-Terminus mit einem Myc-tag fusioniert. Die Zusammensetzung der Puffer und Acrylamid-Gele sind in Tabelle 7 angegeben.

Das Zentrifugations-Protokoll für die Isolation der Membranfraktion orientierte sich an den Angaben aus der Publikation von Leduc-Nadeau *et al.* [189]. Die Oozyten wurden in HbA-Puffer („homogenization buffer A“, 50 µl pro Oozyte) durch Pipettieren (circa 30-40x) homogenisiert und 2x mal bei 200 rpm (10 min, 4 °C) zentrifugiert, wobei jeweils nur der Überstand weitergeführt

wurde. Anschließend wurde der Überstand für 30 min (13.000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Das Pellet enthält eine Anreicherung der Zellmembran und wurde in Probenpuffer resuspendiert (40 µl des 1x Probenpuffers pro 10 Oozyten) und für 10 min bei 60 °C erhitzt. Für die SDS-PAGE mit 10 % Acrylamidgelen wurden jeweils 20 µl Probe aufgetragen.

Die Proteine aus dem Gel wurden per Semidry-Blotting Verfahren (bei 10 V bzw. 80 mA, 2 h) auf eine PVDF-Membran übertragen (Immobilion-P, Porengröße 0.45 µM, von Roth, Deutschland). Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit Magermilchpulver blockiert. Es standen zwei polyklonale Primär-Antikörper gegen den c-Myc-tag zur Verfügung: Antikörper (A-14) sc-789 von Santa Cruz (USA) und Antikörper C3956-2MG von Sigma-Aldrich (Deutschland). Beide wurden jeweils als 1:5000 Verdünnung in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Nach 3x Waschen mit TBS-T für je 10 min folgte der Sekundär-Antikörper (anti-Rabbit Alkaline Phosphatase A3687, Sigma-Aldrich, Deutschland), welcher ebenfalls als 1:5000 Verdünnung in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert wurde. Nach erneuten 3x Waschen mit TBS-T wurde die Detektionslösung hinzugegeben. Die Farbreaktion wurde mit TBS-T gestoppt, nachdem eine ausreichende Signalstärke erreicht wurde (jedoch maximal 10 min). Die Blots wurden anschließend eingescannt und archiviert.

4.1.8 Kultivierung der Mikroalge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

Kulturen der Alge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 wurden über Prof. Suneel Kateriya (University of Delhi South Campus, Indien) bezogen. Flüssigkulturen wurden in Medium für Algen (siehe Tabelle 10) bei 180 rpm in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert. Dies erfolgte bei Raumtemperatur und einer Lichtintensität (Weißlicht) von circa 25 W/m². Mikroskopie-Aufnahmen der Algen, welche in Abbildung 71 gezeigt sind, wurden in der AG Hermann (Institut für Biologie, HU-Berlin) aufgenommen. Die Langzeit-Kultivierung in Agar-Röhrchen wurde von der Technischen Assistentin Margrit Michalsky übernommen.

4.2 „Two-Elektrode Voltage Clamp“- Messung an Oozyten

4.2.1 Präparation und Mikroinjektion der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Pflege der afrikanischen Krallenfrösche (Nasco, USA) und die Entnahme der Oozyten aus den Ovarien wurde von der Technischen Assistentin Maila Reh durchgeführt. Ganzjährig wurden die Frösche bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus und bei 18 °C gehalten. Als Wasser diente unbehandeltes Leitungswasser, wobei dieses über ein geschlossenes handelsübliches Aquariums- Filtersystem gereinigt wurde. Zusätzlich wurde jede Woche das Wasser in den Aquarien je zur Hälfte mit frischem Leitungswasser ausgetauscht.

Für die Entnahme der Ovarien wurden die Frösche in Narkoselösung betäubt, ein Teil der Ovarien entnommen und die Wunde vernäht. Die Zusammensetzung der Narkoselösung und der anderen Lösungen für die Oozyten sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Oozyten wurden nach der Entnahme aus dem Bauchraum zuerst in Ca²⁺-freien ORI-Puffer mit Skalpellen mechanisch aus den Ovarien gelöst. Anschließend erfolgte ein Kollagenase-Verdau für 2 h bei 18 °C, welcher mit BSA-haltigen ORI-Puffer gestoppt wurde. Zuletzt erfolgte die Entfernung der Ovarialfollikel von den Oozyten mit Glaspipetten

per Hand. Hierbei wurden Oozyten im Reifestadium V-VI ausgewählt. Bis zu der Injektion wurden die Oozyten bei 4 °C in ORI-Puffer mit Antibiotikum gelagert.

Die Oozyten wurden mit einem Mikroinjektor mit je 30 ng cap-RNA (siehe Abschnitt 4.1.6) injiziert und bei 18 °C in einem abgedunkelten Inkubator für 4 Tage in ORI-Puffer mit Antibiotika inkubiert. Standardmäßig enthielt der ORI-Puffer für die Inkubation nach der Injektion zusätzlich 5 µM all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich, Deutschland).

4.2.2 TEVC-Messungen an Oozyten

Der Transport von Ionen über die Zellmembran entspricht einem elektrischen Strom, welcher mit elektrophysiologischen Methoden gemessen werden kann. In dieser Arbeit wurden die lichtabhängigen Photoströme der Rhodopsine mit der der Zwei-Elektroden Spannungsklemme („*Two-Electrode Voltage Clamp*“, TEVC) an Oozyten und der „*Patch-Clamp*“-Technik (siehe Abschnitt 4.3) an HEK293-Zellen untersucht.

Die TEVC-Methode ist im Vergleich zu der „*Patch-Clamp*“-Technik leichter in der Handhabung und war daher die Methode der Wahl für das Screening von verschiedenen Konstrukten und deren Mutanten. Abbildung 73A zeigt die Geometrie der Belichtung der Oozyten. Die Oozyten waren stets mit dem extrazellulären Messpuffer bedeckt. Über einen Lichtleiter wurde das Licht von einer 75 W Xenonlampe für die IV-Messungen an die Oozyte so dicht wie möglich herangeführt, wobei der Lichtleiter selbst in den Messpuffer mit eintauchte. Die Lichtintensität am Ausgang vom Lichtleiter lag in Abhängigkeit vom Breitbandfilter und Lampenalter im Bereich von 2,5-4 mW/mm². Dies entspricht unter Einbeziehung der variierenden Oozytengrößen circa 1-5 mW pro Oozyte. Die Transmissionsspektren der Filter sind in Abbildung 74 gezeigt.

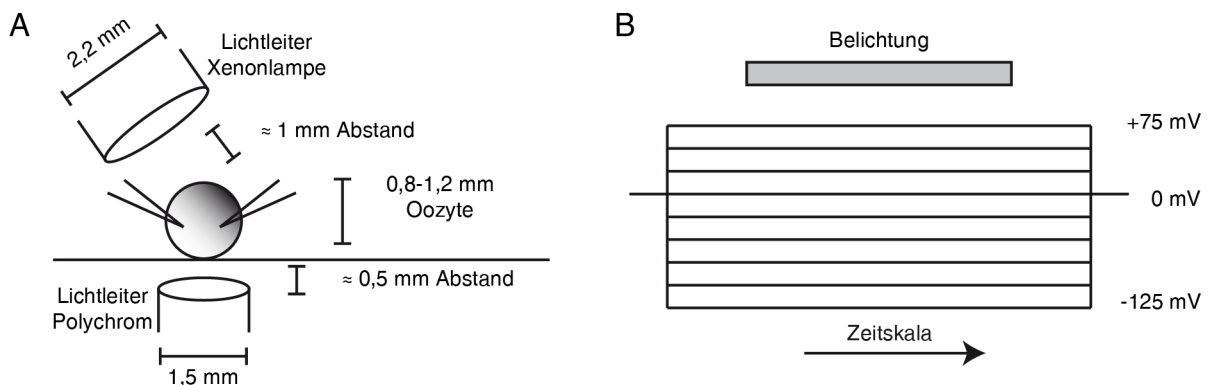


Abbildung 73: TEVC-Messung von Photoströmen an der Oozytenmembran. A: Gezeigt sind der Aufbau und die Geometrie der Belichtung am Oozyten-Messplatz. Für die IV-Messungen wurde eine Xenonlampe als Lichtquelle verwendet, deren Licht über einen Lichtleiter zu der Oozyte herangeführt wurde. Für Aktionsspektren wurden die Oozyten von unten über einen „Polychrom II“ als Lichtquelle belichtet. Die Oozyte befand sich in einer Badlösung (=extrazellulärer Puffer). Zu Übersichtlichkeit sind keine Badelektroden gezeigt. B: Standard-Messprotokoll für Oozyten. Ausgehend von einer Ruhe-Haltespannung von 0 mV wurden jeweils verschiedene Spannungen von -125 mV bis +75 mV getestet. Innerhalb eines jeweiligen Spannungsschrittes wurde die Oozyte zusätzlich belichtet, um den lichtabhängigen Strom zu messen.

Aktionsspektren wurden mit Hilfe eines „Polchrom II“ (Till photonics, Deutschland) gemessen. Der Lichtleiter wurde von unten an die Oozyte herangeführt, welche auf einem Deckglas positioniert war. Die Lichtintensität des Polychrom war von der Wellenlänge abhängig (für eine Oozyte mit 1.0 mm Durchmesser: 1.6 mW/Oozyte bei 468 nm, 0.5 mW/Oozyte bei 700 nm). Die Spektren wurden

nachträglich auf einen gleichen Photonenfluss korrigiert, wobei die Photonenanzahl bei 468 nm als Referenz gewählt wurde.

Die Messungen an den Oozyten erfolgten unter kontrollierten Halte-Spannungen („*voltage-clamp mode*“). Abbildung 73B zeigt das Standard-Messprotokoll am TEVC-Messplatz. Das Ruhepotential der Oozyten im Standardpuffer (100 mM NaCl, pH=7.5) betrug circa -30 bis -20 mV. Anschließend wurden die Oozyten ausgehend von 0 mV auf verschiedene Haltespannungen geklemmt und belichtet. Das Messsignal entspricht dem Strom, welcher notwendig ist, um das jeweilige Haltepotential zu halten. Weitere Details sind bei den einzelnen Messungen angegeben. Die Auswertung der Daten ist in Abschnitt 4.2.4 beschrieben.

Die Glaskapillaren für die TEVC-Messungen hatten Widerstände im Bereich von 0,4 bis 1,5 M Ω und wurden mit 3 M KCl-Lösung befüllt. Für die Badelektroden wurden Agar-Brücken (3 M KCl, 2 % Agar) verwendet. Die Ströme wurden direkt mit dem Verstärker auf 1,0 kHz gefiltert, wobei die Aufnahmezeit 10,0 kHz betrug. Als Mess-Software wurde pCLAMP 9.0 verwendet (Molecular Devices, USA). Die Details der technischen Geräte sind in Tabelle 13 aufgelistet.

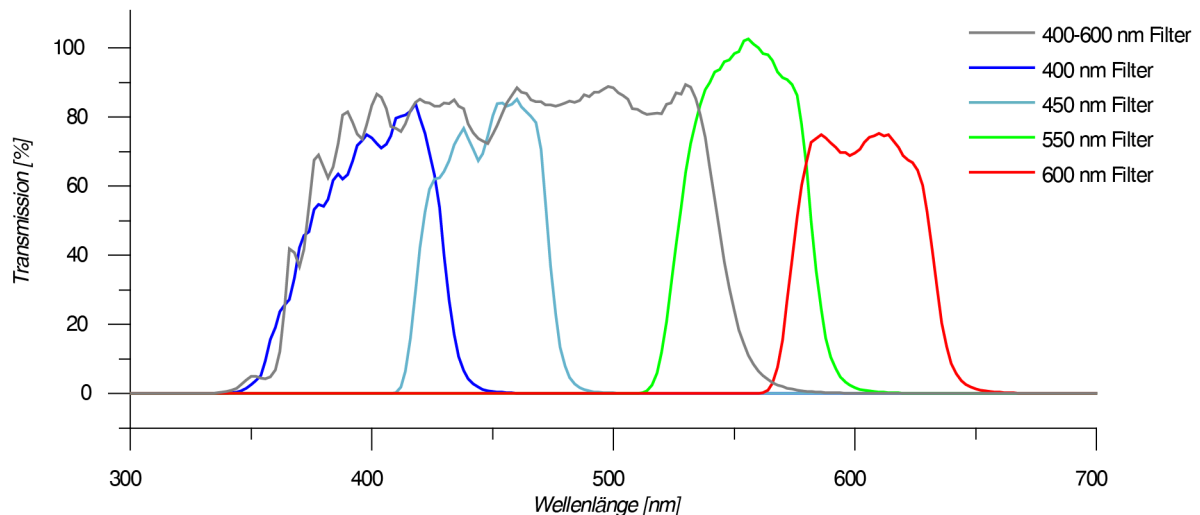


Abbildung 74: Transmissionsspektren der Breitbandfilter. Diese Filter wurden bei der Belichtung der Oozyten eingesetzt, um sekundäre Photoreaktionen zu unterbinden. Die Spektren wurden mit einem UV-Vis Spektrophotometer gemessen (Shimadzu, UV-2600).

4.2.3 Messpuffer für die Experimente an Oozyten

Die Messpuffer für die Oozyten wurden vor den Messungen im Oozyten-Inkubator auf 18 °C temperiert. Der Puffer „Na 7.5“ diente als Standard- und Referenzpuffer bei den meisten Messungen. Die Pufferwechsel wurden per Hand durchgeführt und jeweils viermal mit neuem Puffer gespült. Beim jedem Pufferwechsel wurde nur so viel vom vorherigen Puffer abgenommen, dass die Oozyten mit den Pipetten noch komplett bedeckt blieben.

Tabelle 4: Messpuffer für die Oozyten. Die Bezugsquellen der Chemikalien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Abkürzung	Zusammensetzung [mM]	pH-Wert
Na 10.0	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	10.0 mit NaOH
Na 9.0	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	9.0 mit NaOH
Na 7.5	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.5 mit NaOH
Na 7.2	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.2 mit NaOH
Na 6.0	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	6.0 mit NaOH
Na 5.0	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure/Na-Citrat [5]	5.0 mit NaOH
Na 4.0	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure/Na-Citrat [5]	4.0 mit NaOH
Na 3.8	NaCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure/Na-Citrat [5]	3.8 mit NaOH
KCl 10.0	KCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	10.0 mit KOH
KCl 7.5	KCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.5 mit KOH
KCl 5.0	KCl [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure [5]	5.0 mit KOH
NMG 10.0	NMG [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	10.0 mit HCl
NMG 9.0	NMG [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	9.0 mit HCl
NMG 7.5	NMG [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.5 mit HCl
NMG 5.0	NMG [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure [5]	5.0 mit HCl
NMG 4.0	NMG [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure [5]	4.0 mit HCl
Na-Gluk 10.0	Na-Glukonat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	10.0 mit NaOH
Na-Gluk 7.5	Na-Glukonat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.5 mit NaOH
Na-Gluk 4.0	Na-Glukonat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Zitronensäure [5]	4.0 mit NMG
Na-Asp 9.0	Na-Aspartat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], Glycin [5]	9.0 mit NaOH
Na-Asp 7.5	Na-Aspartat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	7.5 mit NaOH
Na-Asp 6.0	Na-Aspartat [100], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [0.1], MOPS [5]	6.0 mit NaOH

4.2.4 Analyse und Auswertung der Daten

Die Messungen wurden mit der Software Clampfit 10 (Molecular Devices, USA) ausgewertet. Für die Strom-Spannungs-Plots und Aktionsspektren wurde der stationäre Strom ausgewertet (siehe Abbildung 5). Die gezeigten Stromspuren wurden zur besseren Erkennbarkeit zusätzlich mit 500 Hz gefiltert („Gauss-lowpass cutoff“-Filter) und die „baseline“ der Dunkelströme angepasst (Dunkelströme: stationäre Ströme ohne Belichtung verursacht durch endogene Transporter bzw. durch Leck-Ströme). Kinetische Fits der Stromspuren wurden ebenfalls mit Clampfit durchgeführt. Weitere Details sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

4.2.5 Laser-Messungen an Oozyten

Für die Laser-Messungen der Protonenpumpe GR wurde ein Brilliant B Nd-YAG-Laser (Quatel, Frankreich) verwendet. Die Anregung bei 550 nm wurde über einen Rainbow OPO (OPOTEK, USA) erreicht. Im Gegensatz zu allen anderen Oozyten-Messungen wurde ein Tec-05X Verstärker (npi

electronic GmbH, Deutschland) verwendet. Die Ströme wurden direkt mit dem Verstärker auf 20 kHz gefiltert, wobei die Aufnahmezeit 250 kHz betrug. Für die Darstellung der Stromspuren in Abbildung 23 wurden die Signale nachträglich mit 1 kHz gefiltert („*Gauss-lowpass cutoff*“-Filter mit der Software Clampfit 10.0, Molecular Devices, USA).

4.3 Experimente mit HEK293-Zellen

4.3.1 Kultivierung und Transfektion der HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen (DSMZ, Nr. ACC-305) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Standard-Medium diente DMEM, welches mit 10 % FKS (v/v) supplementiert war (weitere Details zu den Medien und Zusatzstoffen sind in Tabelle 11 aufgelistet). Zusätzlich wurde das Medium mit Penicillin und Streptomycin als Antibiotika ergänzt. Das Passagieren der Zellen erfolgte mit Trypsin („TrypLE Express“), wobei die Zellen jeweils bis zur 20. Passage verwendet wurden. Zum Waschen der Zellen wurde PBS verwendet. Die Kultivierung erfolgte standardmäßig in T25-Zellflaschen (TPP, Schweiz) mit 5 ml Medium. Für die Transfektion und anschließenden Messungen wurden die Zellen in kleinen Zellkulturschalen mit Deckgläschen (0,2x10⁶ Zellen in 2 ml Medium) kultiviert. Für die Transfektion der Zellen wurde die Transfektions-Reagenz FuGENE HD (Promega, USA) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden die Zellen mit all-*trans*-Retinal (1 µM als Endkonzentration) supplementiert. Nach 24-30 h Expressionszeit wurden die Zellen gemessen.

Für die Experimente mit Chr2-WT wurde eine stabile Zelllinie mit Chr2-YFP verwendet [128], welche ihren Ursprung in HEK293-Zellen hatte. Als Selektionsmarker für die stabile Zelllinie dienten Zeocin und Blastidin, welche dem Medium zusätzlich hinzugegeben wurden. Die Expression von Chr2-YFP wurde durch Zugabe von Tetrazyklin induziert. Alle anderen Abläufe waren identisch zu den transfizierten Zellen.

4.3.2 Serum-freie Kultivierung der HEK293-Zellen

Sowohl die HEK293-Zellen als auch die stabile Chr2-Zelllinie wurden auch Serum-frei kultiviert, um Kontaminationen durch Retinal (+Derivate) aus dem Serum zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellen in Advanced-DMEM (Life Technologies, USA) als Nährmedium kultiviert ohne Zusatz von FKS und Penicillin+Streptomycin. Für adhärentes Wachstum mussten die Zellkulturflaschen und die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Hierfür wurden die Flaschen für 1 h bei RT mit einer Lösung von 25 % Poly-L-Lysin (v/v, in PBS verdünnt) beschichtet und danach mit PBS kurz gewaschen. Die Deckgläschen wurden kurz mit einem Brenner abgeflammt und mit je 2-5 µL Poly-L-Lysin (100 %) pro Deckglas beschichtet (1 h, ohne Waschen).

4.3.3 „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen

„Patch-Clamp“-Messungen wurden hauptsächlich für die Untersuchung der Retinal-Analoga angewendet. Alle Messungen erfolgten in der „*whole-cell*“-Konfiguration und erlaubten kontrollierte intrazelluläre und extrazelluläre Pufferbedingungen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Messpuffer für die „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (OM 815, Vogel, Deutschland) jeweils mit Glukose auf die gewünschte Osmolarität eingestellt. Die Bezugsquellen der Chemikalien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Puffer	Zusammensetzung [mM]	pH-Wert	Osmolarität
Extrazellulärer Puffer	NaCl [140], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [1.0], KCl [1.0], HEPES [10]	7.2 mit NMG	320 mOsm
Intrazellulärer Puffer	NaCl [110], MgCl ₂ [1.0], CaCl ₂ [1.0], KCl [5.0], HEPES [10], EGTA [10]	7.2 mit NMG	290 mOsm

Abbildung 75A zeigt schematisch die Geometrie an einer gemessenen Zelle. Als Lichtquelle für alle Messungen diente ein „Polychrom V“ (TILL Photonics, Deutschland), welcher mit der Software TillVision (TILL Photonics, Deutschland) gesteuert wurde. Mit Hilfe eines motorisierten Filtrerrades (NSND-3, Newport, USA) konnte die Lichtintensität bei verschiedenen Wellenlängen direkt während der Messung auf einen gleichbleibenden Photonenfluss eingestellt werden. Somit konnte das Problem der verschiedenen Lichtintensitäten bei verschiedenen Wellenlängen behoben werden. Die Etablierung der Filtrerräder an den „Patch-Clamp“-Messplätzen ist Jonas Wietek zu verdanken. Das Licht vom „Polychrom V“ wurde über ein Lichtleiter in das Mikroskop eingekoppelt. Die Zellen wurden direkt über das Objektiv vom Mikroskop belichtet. Die jeweiligen Details und Lichtintensitäten (im Bereich von circa 0.1 bis 0.3 mW/mm²) sind bei den einzelnen Messungen mit angegeben. Die Datenauswertung erfolgte grundsätzlich wie bei Oozyten in Abschnitt 4.2.4. In Abbildung 75B ist das Standard-Messprotokoll für IV-Messungen gezeigt. Im Unterschied zu den Oozyten (Abbildung 73) wurde die Zellen nur bei Halte-Spannungen von -60 mV bis +40 mV gemessen (in 20 mV Schritten).

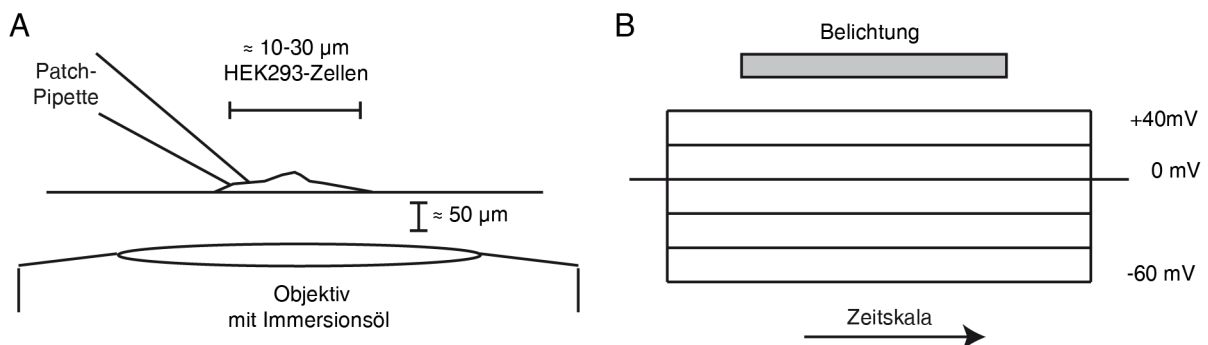


Abbildung 75: „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen. Gezeigt sind der Messaufbau direkt an der Zelle und das Standard-Messprotokoll für IV-Messungen.

Die Glaskapillaren für die „Patch-Clamp“-Messungen hatten Widerstände im Bereich von 1,2-3,0 MΩ und wurden mit dem intrazellulären Messpuffer befüllt. Für die Badelektrode wurden Agar-Brücken verwendet (extrazellulärer HEK-Puffer, 2 % Agar). Die Ströme wurden direkt mit dem Verstärker auf 1 kHz (*lowpass*) gefiltert, wobei die Aufnahmezeit 20 kHz betrug. Als Mess-Software wurde pCLAMP 10.0 verwendet (Molecular Devices, USA). Die Details der technischen Geräte sind in Tabelle 14 aufgelistet.

5 Anhang

5.1 Bezugsquellen der Retinal-Analoga

Tabelle 6: Bezugsquellen der Retinale. Die Retinale wurden lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Als Lösungsmittel für die Stammlösungen (10 mM) diente Isopropanol. Die Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80 °C in Stickstoff-Atmosphäre, um Oxidation zu verhindern. Die Strukturen sind in Abbildung 52 gezeigt.

Bezeichnung	Bezugsquelle
all- <i>trans</i> -Retinal	Sigma-Aldrich (Deutschland)
(3,4)-Didehydro-Retinal	TRC (Kanada)
3-Hydroxy-Retinal	TRC (Kanada)
4-Hydroxy-Retinal	TRC (Kanada)
Dimethylamino-Retinal	AG Gottschalk, Goethe-Universität Frankfurt a.M.
Indol-Retinal	Dr. David Woodmansee (AG-Trauner, LMU-München)
Trimethoxy-Retinal	Dr. David Woodmansee (AG-Trauner, LMU-München)
Naphthyl-Retinal	Dr. David Woodmansee (AG-Trauner, LMU-München)
Thiophen-Retinal	Dr. David Woodmansee (AG-Trauner, LMU-München)

5.2 Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen

Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen für molekularbiologisches Arbeiten.

Bezeichnung	Bestandteile als Endkonzentration	Bezugsquelle	Verwendung	zusätzl. Informationen
LB-Medium (lysogeny broth)	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt in H ₂ O	Roth Becton Dickinson Becton Dickinson	Nährmedium für <i>E.coli</i>	autoklaviert
LB-Agar-Platten	15 g/l Agar in LB-Medium	Becton Dickinson	Einzelkolonien	autoklaviert
Na-Ampicillin	0,1 mg/ml in LB-Medium	Roth	Selektionsmarker in LB-Medium/Platten	100 mg/ml Stammlösung in H ₂ O, steril filtriert, -20 °C
Kanamycin-Sulfat	0,03 mg/ml in LB-Medium	Roth	Selektionsmarker in LB-Medium/Platten	30 mg/ml Stammlösung in H ₂ O, steril filtriert, -20 °C
TAE-Puffer	1 mM Na-EDTA 20 mM Eisessig 40 mM Tris-HCl in H ₂ O, pH 8.5	Roth Roth Roth	Gelelektrophorese	als 50x Stammlösung
1 % Agar-Gele	10 g/l Agar 0,5 µg/l EtBr in TAE-Puffer	Roth Sigma-Aldrich	Gelelektrophorese	EtBr als 10 mg/ml Stammlösung in H ₂ O
HbA-Puffer (homogenization buffer A)	20 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM Na ₂ HPO ₄ 80 mM Saccharose 0,1 mM PMSF in H ₂ O, pH 7.6	Roth Roth Roth Merck Roth	Puffer für Aufreinigung der Oozyten-Membranfraktion	- ohne EDTA - PMSF als 0,1 M Stammlsg. in Isopropanol
4x Sammelgel -puffer	0,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS in H ₂ O, pH 6.8	Roth Roth	für Sammelgel	
4x Trenngel -puffer	1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS in H ₂ O, pH 8.8	Roth Roth	für Trenngel	
Polyacrylamid-Sammelgel (3,8%) für 5 ml	3,25 ml H ₂ O 1,25 ml 4xSammel-B. 0,625 ml Acrylamid 100 µl APS	Roth Roth	SDS-PAGE	Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)

	10 µl TEMED	Roth		
Polyacrylamid – Trenngel (10%) für 15 ml	6 ml H ₂ O 3,75 ml 4xTrenn-B. 5 ml Acrylamid 100 µl APS 10 µl TEMED	Roth Roth Roth	SDS-PAGE	Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
1x Probenpuffer	125 mM Tris-HCl 4% (w/v) SDS 97,5 mM DTT 20 % Glycerin (v/v) Bromphenolblau in H ₂ O, pH 6.8	Roth Roth Roth Roth Sigma-Aldrich	SDS-PAGE	2 µl gesättigte Bromphenolblaulösung in H ₂ O pro 1 ml Puffer
1x Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS	Roth Roth Roth	SDS-PAGE	
1x Blotting-Puffer	20 mM Tris-HCl 154 mM Glycin 0,08 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol	Roth Roth Roth Roth	Western-Blotting	die PVDF-Membran wurde vor dem Blot für 5 min in Methanol inkubiert
TBS-T	5 mM Tris-HCl 15 mM NaCl 0,5 ml/l Tween-20 in H ₂ O, pH 7.5	Roth Roth Roth	Western-Blotting	
Blockierlösung	4 % Milchpulver (g/v) In TBS-T	Roth	Western-Blotting	jeweils frisch angesetzt
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,05 MgCl ₂ 0,06 mg/ml NTB 0,23 mg/ml BCIP in H ₂ O, pH 9.5	Roth Roth Roth Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich	Western-Blotting	NTB und BCIP jeweils als Stammlösung in Dimethylformamid gelöst
H ₂ O	/	EVOQUA ULTRA CLEAR (Deutschland)	Puffer/Lösungen	Reinstwasseranlage
Dimethylformamid	/	Sigma-Aldrich	Lösungsmittel	
Ethanol	/	Roth	RNA-Fällung	
Isopropanol	/	Roth	Für Retinale, Western-Blotting	
HCl	/	Roth	pH-Wert	
NaOH	/	Roth	pH-Wert	

Tabelle 8: Chemikalien speziell für die elektrophysiologischen Messpuffer.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
NaCl	Roth	
KCl	Roth	
LiCl	Merck	
CsCl	Roth	
Na-Glukonat	Sigma-Aldrich	Ersatz für Chlorid
Na-Aspartat	Sigma-Aldrich	Ersatz für Chlorid
NMG	Sigma-Aldrich	Ersatz für Natrium
MgCl ₂	Roth	
CaCl ₂	Roth	
HCl	Roth	pH-Wert
NaOH	Roth	pH-Wert
KOH	Roth	pH-Wert
MOPS	Roth	Puffer
HEPES	Roth	Puffer
Zitronensäure	Roth	Puffer
Tri-Na-Citrat	Merck	Puffer
Glukose	Roth	Osmolarität
EGTA	Roth	Calcium-Chelator
Glycin	Roth	Puffer

5.2 Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen

Tabelle 9: Puffer für Oozytenaufreinigung und Inkubation.

Bezeichnung	Bestandteile als Endkonzentration	Bezugsquelle	Verwendung	zusätzl. Informationen
Oozyten Ringer Lösung (ORI)	96 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM MOPS 50U Penicillin + Streptomycin 5 µM all- <i>trans</i> -Retinal in H ₂ O, pH 7.5	Roth Roth Roth Roth Roth Biochrom Sigma-Aldrich	Inkubation der Oozyten	Antibiotika wurden erst kurz vor Gebrauch hinzu gegeben, Retinal wurde nur in den ORI-Puffer für die 4-tägige Expression hinzugegeben
Ca ²⁺ freier ORI	Wie ORI, aber ohne 2 mM CaCl ₂	/	für Kollagenase-Lösung	
Kollagenase-Lösung	2 mg/ml Collagenase (Typ Cls) in Ca ²⁺ freien ORI	Biochrom	Vereinzeln der Oozyten	
Blockierlösung	1 mg/ml BSA (Rinder-Albumin) in ORI-Puffer	Sigma-Aldrich	Blocken der Kollagenase	
Betäubungs-Lösung	2 g/l Tricaine in Leitungswasser, auf pH 7.5 eingestellt	Sigma-Aldrich	Betäubung der Frösche für OP	CAS-Nr. von Tricaine: 886-86-2

Tabelle 10: Kultivierung der Alge *Coccomyxa subellipsoidea* C-169.

Bezeichnung	Bestandteile als Endkonzentration	Bezugsquelle	Verwendung	zusätzl. Informationen
Algen-Medium „Kuhl-Medium“	10 mM KNO ₃ 4,5 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 1 µM MnSO ₄ 1 µM ZnSO ₄ 0,5 µM H ₃ BO ₃ 0,01 µM CuSO ₄ 0,01 µM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 25 µM FeSO ₄ 25 µM Na ₂ -EDTA in H ₂ O, pH≈5.8	Roth Merck Roth Roth Roth Sigma-Aldrich Merck Sigma-Aldrich Altbestand aus DDR Sigma-Aldrich Merck Roth	Flüssigkultur der Alge	-Kulturmedium wurde autoklaviert, CaCl ₂ wurde erst nach der Autoklavierung als steril-filtrierte Lösung hinzugegeben - Fe-EDTA-Komplex bildet sich durch Erhitzen (FeSO ₄ + Na ₂ -EDTA)
Agar-Röhrchen	5 g/l Agar (0,5 %) in Kuhl-Medium	Roth	Kultur in Agar-Röhrchen	autoklaviert

Tabelle 11: Medien und Chemikalien für die Zellkultur.

Bezeichnung	Bestandteile als Endkonzentration	Bezugsquelle	Verwendung	zusätzl. Informationen
Tetrazyklin - Hydrochlorid	2 µM Tetrazyklin	Sigma-Aldrich (Deutschland)	Induktion der stabilen ChR2-Zelllinie	steril filtriert, 4 mM Stammlösung in Ethanol
DMEM Medium	/	Biochrom/Merck (Deutschland)	Kultivierung der HEK-Zellen	
Penicillin + Streptomycin	100 U	Life Technologies/GIBCO (USA)	Zusatz zum Medium	10 000 U/ml vom Hersteller
PBS	/	Biochrom/Merck (Deutschland)	Waschen der Zellen	
Fetales Kälber Serum (FKS)	10 % (v/v)	Biochrom/Merck (Deutschland)	Zusatz zum Medium	

Advanced DMEM Medium	/	Life Technologies/GIBCO (USA)	Serumfreie Kultivierung der HEK-Zellen	ohne Antibiotika
Poly-L-Lysin	100% (v/v) für Deckgläschen, 25 % (v/v) in PBS für Flaschen	Biochrom/Merck (Deutschland)	Beschichtung der Deckgläschen und Kulturflaschen	
Zeocin	200 µg/ml	Life Technologies (USA)	Für stabile ChR2-Zelllinie	100 mg/ml Stammlösung vom Hersteller
Blasticidin	50 µg/ml	InvioGen (USA)	Für stabile ChR2-Zelllinie	10 mg/ml vom Hersteller
TrypLE Express	/	Life Technologies/GIBCO (USA)	Ablösen der Zellen	

5.3 Auflistung der Geräte

Tabelle 12: Geräte für Molekularbiologisches Arbeiten.

Bezeichnung	Vollständiger Name (Hersteller)	Verwendung
Algen-Inkubator	Innova 44 (Eppendorf, Deutschland)	
Blotting-Apparatur	BlueFlash-M (SERVA-Electrophoresis, Deutschland)	Western-Blotting
Spannungsquelle	PowerPac Basic (BIO-RAD, USA)	Elektrophorese/Blotting
Thermomixer	Thermomixer Comfort (Eppendorf, Deutschland)	Transformation, Restriktionsverdau, cap-RNA-Synthese
Tischzentrifuge	MiniSpin (Eppendorf, Deutschland)	Zentrifugation
Tischzentrifuge	Biofuge Pico (Heraeus, Deutschland)	Zentrifugation
Kühl-Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Deutschland)	RNA-Fällung, Isolierung der Membranfraktion aus Oozyten
PCR-Gerät	PCR Sprint (Thermo Scientific, USA)	PCR
PCR-Gerät	Personal Cycler (Biometra, Deutschland)	PCR
Tischinkubator	Ecotron (Infors AG, Schweiz)	Inkubation von <i>E. coli</i> -Kulturen und Agar-Platten
Vakuumkonzentrator	DNA120 SpeedVac (Thermo Scientific, USA)	Cap-RNA-Aufreinigung
Geldokumentation	UV-System (INTAS, Deutschland)	Visualisierung von DNA/RNA, 312 nm
Spektralphotometer	BioSpectrometer basic (Eppendorf, Deutschland)	Absorptionsspektren der Retinal-Analoga
UV-Vis Spektralphotometer	UV-2600 (Shimadzu, Japan)	Messung der Transmissionsspektren der Breitbandfilter

Tabelle 13: Essentielle Geräte für Injektion und Messung der Oozyten.

Bezeichnung	Vollständiger Name (Hersteller)	Verwendung
Mikroskop	Stemi SV6 (Zeiss, Deutschland)	
Verstärker	Turbo Tec-10CX (npi electronic GmbH, Deutschland)	Verstärker für IV-Messungen und Aktionsspektren
Digital-Analog-Wandler	Digidata 1322A (Axon Instruments, Molecular Devices, USA)	
Mikromanipulatoren	(MicroControl, Deutschland)	
Polychrom	Polychrom II (TILL Photonics, Deutschland)	Lichtquelle für Aktionsspektren
„shutter“/Lichtschließer	TTL-2 (ASI, Applied Scientific, USA)	An-/Aus-Schalten der Einkopplung des Lichtes
Borosilikat- Glasskapillaren	1.5 mm x 1.17 mm mit Filament (Havard Apparatus, USA)	Mess-Pipetten
Glasskapillaren	ID = 0.530 mm ± 25 µm, OD 1.14 mm (World Precision Instruments, USA)	Pipetten für Mikroinjektion
Glasskapillaren -Puller	Micropipette Puller P-97 (Sutter Instruments, USA)	Herstellung der Glaskapillaren für die Elektroden/Mikroinjektion
Mikroinjector	World Precision Instruments Nanoliter 2000	Injektion der Oozyten
Breitbandfilter	(Balzers, Lichtenstein)	
Optometer	Gigahertz Optik P-9710	Bestimmung der Lichtintensität

Tabelle 14: Geräte für die „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen.

Bezeichnung	Vollständiger Name (Hersteller)	Verwendung
Mikroskop	IX70 (Olympus, Japan)	
CCD-Kamera	AVT-BC 12 (AVT-HORN, Deutschland)	Visualisierung der Zellen
Control Cube	UI-1000-i (Scientifica, UK)	Motorisierte Pipettensteuerung
Verstärker	Axopatch 200B (Axon Instruments, Molecular Devices, USA)	Verstärker für IV-Messungen und Aktionsspektren
Digital-Analog-Wandler	Digidata 1440A (Axon Instruments, Molecular Devices, USA)	Digital-Analog-Wandler
Polychrom	Polychrom V, (TILL Photonics, Deutschland)	Lichtquelle für Aktionsspektren und IV-Messungen
„shutter“/Lichtschließer	S25 shutter (Vincent Associates Uniblitz, USA)	An-/Aus-Schalten der Einkopplung des Lichtes in das Mikroskop
Filterrad	NSND-3 (Newport, USA)	Variation der Lichtintensität um einheitlichen Photonenfluss zu gewährleisten
Graufilter	Schott (Deutschland)	Variation der Lichtintensität unabhängig von der Wellenlänge
Borosilikat- Glasskapillaren	1.5 mm x 0.86 mm mit Filament (Warner Instruments, USA)	„Patch-Clamp“-Pipetten
Glasskapillaren -Puller	Micropipette Puller P-1000 (Sutter Instruments, USA)	Herstellung der Pipetten
Optometer	Gigahertz Optik P-9710	Bestimmung der Lichtintensität

5.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die funktionale Vielfaltigkeit mikrobieller Rhodopsine.....	9
Abbildung 2: Isomerisierung des Retinals in Ionen-transportierenden Rhodopsinen.....	10
Abbildung 3: Der Protonentransport und der Photozyklus von Bakteriorhodopsin.....	11
Abbildung 4: Die protonenmotorische Kraft von Protonenpumpen.....	13
Abbildung 5: Elektrophysiologie von Bakteriorhodopsin.....	14
Abbildung 6: Sequenz-Alignment des Kanalrhodopsins ChR2 mit ausgewählten Protonenpumpen...	19
Abbildung 7: Verwendung mikrobieller Rhodopsine in der Optogenetik.....	20
Abbildung 8: Übersicht über natürlich vorkommende Retinal-Derivate mit ihren verschiedenen Absorptionsmaxima.....	23
Abbildung 9: Stromkurven mikrobieller Ionenpumpen in Oozyten.....	26
Abbildung 10: Aktionsspektren der untersuchten Ionenpumpen in Oozyten.....	27
Abbildung 11: Überblick über die Stromspuren ausgewählter Protonenpumpen in Oozyten.....	29
Abbildung 12: Auswertung der stationären Photoströme aus Abbildung 11.....	29
Abbildung 13: Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme.....	31
Abbildung 14: Abbildungen zum Verständnis der folgenden Analysen und Experimente.....	32
Abbildung 15: Die Umkehrpotentiale und die Protonenmotorischen Kraft der Protonenpumpen.....	33
Abbildung 16: Die Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2 in Oozyten.....	35
Abbildung 17: Amplituden von verschiedener Kanälen und Protonenpumpen in Oozyten.....	36
Abbildung 18: Repräsentative Western-Blots von Membranfraktionen aus Oozyten.....	37
Abbildung 19: Vergleich der Stromamplituden von Rhodopsinen in HEK293-Zellen.....	38
Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen verschiedener mikrobieller Rhodopsine in HEK293-Zellen.....	40
Abbildung 21: Stromspuren von GR-WT bei verschiedenen Haltespannungen und extrazellulären pH-Werten.....	41

Abbildung 22: Detailliertere Untersuchung von GR-WT in Oozyten.....	42
Abbildung 23: Aktionsspektren und Laser-Messungen an GR.	43
Abbildung 24: Sequenz- und Strukturanalyse von GR.....	44
Abbildung 25: Mutationsanalyse des primären Protonendonors in GR.	45
Abbildung 26: Mutationsanalyse der extrazellulären Seite von GR.	46
Abbildung 27: Untersuchung weiterer Positionen in GR.	47
Abbildung 28: Umkehrpotentiale von ausgewählten GR-Mutanten.	48
Abbildung 29: Doppelpulsexperimente von GR-WT, GR-E132D, ESR-WT und CsR-WT.....	49
Abbildung 30: Übersicht über mutierte Positionen in CsR.....	51
Abbildung 31: Charakterisierung von CsR-WT in Oozyten.....	52
Abbildung 32: Untersuchung des intrazellulären Halbkanales von CsR.....	54
Abbildung 33: Untersuchung des primären Protonenakzeptors von CsR anhand der Mutante D86T.	56
Abbildung 34: Erweiterte Untersuchung des primären Protonendonors und umgebender Positionen.	57
Abbildung 35: Untersuchung potentiell wichtiger Positionen zwischen dem Gegenion-Komplex und der extrazellulären Seite von CsR.....	59
Abbildung 36: Strom-Spannungskurven der Mutanten aus Abbildung 35.	60
Abbildung 37: Untersuchung der extrazellulären Glutamate von CsR.....	61
Abbildung 38: Untersuchung von Positionen an der Retinal-Bindetasche.	62
Abbildung 39: Umkehrpotentiale ausgewählter CsR-Mutanten.....	63
Abbildung 40: Detaillierte Untersuchung des Pump-Kanal-Dualismus von CsR-R83Q mit Hilfe von Doppelmutanten.	65
Abbildung 41: Kombination der R83Q-Mutante mit der intrazellulären T46N-Mutation.	66
Abbildung 42: Mutationen der Retinal-Bindetasche in Kombination mit der R83Q-Mutante.	67
Abbildung 43: Untersuchung der Positionen R82 und Y57 in β -BR.....	68
Abbildung 44: Untersuchung der Positionen R118 und Y88 in GR (\triangle BR-R82 und Y57).	69
Abbildung 45: Untersuchung der Mutante Mac-R136Q (\triangle BR-R82).	70
Abbildung 46: Untersuchung der Photoströme von cChR1-WT und cChR1-T198M.....	71
Abbildung 47: Erweiterte Auswertung der stationären Photoströme von ChR1-T198M.	72
Abbildung 48: Untersuchung der Na ⁺ -Selektivität von ChR1-T198M im Vergleich zum WT.	74
Abbildung 49: Exemplarische Stromspuren verschiedener hChR2-Mutanten.	76
Abbildung 50: Auswertung der stationären Photoströme der ChR2-Mutanten.....	77
Abbildung 51: Detaillierte Untersuchung der Photoströme von ChR2-TC-E90K im Vergleich zu ChR2- TC.....	78
Abbildung 52: Strukturformeln und Absorptionsmaxima der Retinal-Analoga.....	80
Abbildung 53: Untersuchung der Retinale in Oozyten.....	81
Abbildung 54: Typische Stromspuren von ChR2-WT mit verschiedenen Retinal-Analoga.	82
Abbildung 55: Kinetiken und Amplituden von ChR2-WT mit verschiedenen Retinal-Analoga.....	83
Abbildung 56: Aktionsspektren von ChR2 mit verschiedenen Retinal-Analoga.	84
Abbildung 57: Spektren und Amplituden der synthetischen Retinal-Analoga in Kombination mit Arch- 3.....	85
Abbildung 58: Verschiedene spekulative Modelle des Pump-Kanal-Dualismus in Form von schematischen Photozyklen.	87
Abbildung 59: Erklärung der Peak-Ströme durch Addition eines aktiven Pumpstroms mit einem passiven Protonentransport.....	88
Abbildung 60: Umkehrpotentiale eines hypothetischen Konstruktes mit Pump-Kanal-Dualismus....	90

Abbildung 61: Vergrößerte Darstellung von Pumpen mit Pump-Kanal-Dualismus in der Nähe der jeweiligen Umkehrpotentiale.....	91
Abbildung 62: Modell der Überlagerung von passiven stationären Photoströmen mit transienten Photoströmen.....	92
Abbildung 63: Eingruppierung der experimentell bestimmten Umkehrpotentiale in verschiedene Klassen.....	93
Abbildung 64: Vergleich des intrazellulären Halbkanales der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9).....	95
Abbildung 65: Vergleich des Gegenion-Komplexes der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9).	97
Abbildung 66: Vergleich des extrazellulären Halbkanales der Protonenpumpe BR (1C3W) und der Kanalrhodopsine-Chimäre C1C2 (3UG9).	99
Abbildung 67: Die Kristallstruktur von Xanthorhodopsin (3DDL).	101
Abbildung 68: Vergleich der Retinal-Bindetaschen der Protonenpumpe Arch-2 (2EI4) und der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2 (3UG9).	102
Abbildung 69: Modell zur Erklärung des Pump-Kanal-Dualismus.	105
Abbildung 70: Räumlicher Ablauf des Protonentransportes in Protonenpumpen am Beispiel von BR.	106
Abbildung 71: Bilder der arktischen Alge <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169.....	109
Abbildung 72: Expressionskassetten im pGEMHE- und CMV-Vektor.	113
Abbildung 73: TEVC-Messung von Photoströmen an der Oozytenmembran.....	117
Abbildung 74: Transmissionsspektren der Breitbandfilter.	118
Abbildung 75: „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen.	121

5.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Expression und das Targeting verschiedener Rhodopsine.	40
Tabelle 2: Auflistung der experimentell untersuchten Rhodopsine und deren Bezugsquellen.	112
Tabelle 3: Pipettierschema und das Protokoll für die Standard-Klonierungs-PCR.....	114
Tabelle 4: Messpuffer für die Oozyten.....	119
Tabelle 5: Messpuffer für die „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen.	121
Tabelle 6: Bezugsquellen der Retinale.	122
Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen für molekularbiologisches Arbeiten.	122
Tabelle 8: Chemikalien speziell für die elektrophysiologischen Messpuffer.	123
Tabelle 9: Puffer für Oozytenaufreinigung und Inkubation.	124
Tabelle 10: Kultivierung der Alge <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169.	124
Tabelle 11: Medien und Chemikalien für die Zellkultur.	124
Tabelle 12: Geräte für Molekularbiologisches Arbeiten.	125
Tabelle 13: Essentielle Geräte für Injektion und Messung der Oozyten.....	125
Tabelle 14: Geräte für die „Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen.....	126
Tabelle 15: Auflistung der wichtigsten Abkürzungen ohne Standard-Chemikalien/-Puffer.	129

5.6 Abkürzungen

Tabelle 15: Auflistung der wichtigsten Abkürzungen ohne Standard-Chemikalien/-Puffer.

Arch-3	Archaeorhodopsin-3
AS	Aminosäure/-n
ATR	all- <i>trans</i> -Retinal
BLM	Black Lipid Membrane
BR	Bakteriorhodopsin
β -BR	Bakteriorhodopsin mit einer β -Untereinheit einer H,K-ATPase [125]
C1C2	Chimäre aus ChR1 und ChR2
ChR1/ChR2	Kanalrhodopsine-1 und -2 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CMV	DNA-Promotor-Sequenz des humanen Cytomegalo-Virus
CsR	<i>Coccomyxa</i> -Rhodopsin
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ESR	<i>Exiguobacter</i> -Rhodopsin
E17R	Protonenpumpe aus <i>Exiguobacterium sp. S17</i>
FTIR	Fourier-Transformation-Infrarot
GPR	<i>Green</i> -Proteorhodopsin
GR	<i>Gloeobacter</i> -Rhodopsin
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> -Zellen
IV	Strom-Spannungs (-Plot/-Messung/-Diagramm)
LR	<i>Leptosphaeria</i> -Rhodopsin (auch als Mac in Literatur abgekürzt)
Mac	<i>Leptosphaeria</i> -Rhodopsin (auch als LR in Literatur abgekürzt)
mean \pm SE	Mittelwert+Standardfehler
<i>Med12</i>	Proteorhodopsin aus einem marinen Bakterium
NMG	<i>N</i> -Methyl-D-glucamin (als Ersatz für Natrium-Ionen)
NpHR	Halorhodopsins aus <i>Natronomonas pharaonis</i>
pH _o	extrazellulärer pH-Wert
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
RSB	(protonierte) Retinal-Schiff-Base
PRSB	
PMF	<i>Proton Motive Force</i>
PR	Proteorhodopsin (als Sammelbegriff für verschiedene Proteorhodopsine)
TEVC	<i>Two-Elektrode Voltage Clamp</i>
UTR	untranslatierte Bereiche einer mRNA
WT	Wild-Typ
XR	Xanthorhodopsin

6 Literaturverzeichnis

1. O. P. Ernst *et al.*, Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* **114**, 126-163 (2014).
2. S. Kateriya, G. Nagel, E. Bamberg, P. Hegemann, "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci* **19**, 133-137 (2004).
3. G. M. Avelar *et al.*, A rhodopsin-guanylyl cyclase gene fusion functions in visual perception in a fungus. *Curr Biol* **24**, 1234-1240 (2014).
4. D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**, 149-152 (1971).
5. A. Danon, W. Stoeckenius, Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1234-1238 (1974).
6. P. N. Unwin, R. Henderson, Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J Mol Biol* **94**, 425-440 (1975).
7. K. Mitsuoka *et al.*, The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J Mol Biol* **286**, 861-882 (1999).
8. R. Henderson, P. N. Unwin, Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28-32 (1975).
9. E. M. Landau, J. P. Rosenbusch, Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14532-14535 (1996).
10. S. P. Balashov, Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **1460**, 75-94 (2000).
11. J. Heberle, J. Fitter, H. J. Sass, G. Buldt, Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved. *Biophysical chemistry* **85**, 229-248 (2000).
12. I. V. Kalaidzidis, A. D. Kaulen, A. N. Radionov, L. V. Khitrina, Photoelectrochemical cycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 1220-1233 (2001).
13. H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution. *Science* **286**, 255-261 (1999).
14. G. S. Harbison *et al.*, Solid-state ¹³C NMR studies of retinal in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **23**, 2662-2667 (1984).
15. P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, W. Stoeckenius, Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers. *Biochemistry* **28**, 829-834 (1989).
16. H. Patzelt *et al.*, The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9765-9770 (2002).
17. K. Gerwert, E. Freier, S. Wolf, The role of protein-bound water molecules in microbial rhodopsins. *Biochimica et biophysica acta* **1837**, 606-613 (2014).
18. V. A. Lorenz-Fonfria, H. Kandori, Spectroscopic and kinetic evidence on how bacteriorhodopsin accomplishes vectorial proton transport under functional conditions. *J Am Chem Soc* **131**, 5891-5901 (2009).
19. M. Kataoka *et al.*, Energy coupling in an ion pump. The reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **243**, 621-638 (1994).
20. H. J. Sass *et al.*, The tertiary structural changes in bacteriorhodopsin occur between M states: X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. *EMBO J* **16**, 1484-1491 (1997).
21. B. Schobert, L. S. Brown, J. K. Lanyi, Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp-96 and the retinal Schiff base. *J Mol Biol* **330**, 553-570 (2003).
22. E. Freier, S. Wolf, K. Gerwert, Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11435-11439 (2011).

23. A. Popp, M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Bruchle, D. Oesterheld, Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing products in bacteriorhodopsin films. *Biophys J* **65**, 1449-1459 (1993).
24. N. B. Gillespie *et al.*, Characterization of the branched-photocycle intermediates P and Q of bacteriorhodopsin. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 13352-13361 (2002).
25. P. Ormos, Z. Dancshazy, B. Karvaly, Mechanism of generation and regulation of photopotential by bacteriorhodopsin in bimolecular lipid membrane. *Biochim Biophys Acta* **503**, 304-315 (1978).
26. T. A. Krulwich, G. Sachs, E. Padan, Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **9**, 330-343 (2011).
27. L. P. Kayushin, V. P. Skulachev, Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH. *FEBS Lett* **39**, 39-42 (1974).
28. L. A. Drachev *et al.*, Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin. *Nature* **249**, 321-324 (1974).
29. L. A. Drachev *et al.*, Reconstitution of Biological Molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin. *J Biol Chem* **251**, 7059-7065 (1976).
30. L. A. Drachev, A. D. Kaulen, V. P. Skulachev, Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis. *FEBS Lett* **87**, 161-167 (1978).
31. M. Eisenbach, C. Weissmann, G. Tanny, S. R. Caplan, Bacteriorhodopsin-loaded charged synthetic membranes. Utilization of light energy to generate electrical current. *FEBS Lett* **81**, 77-80 (1977).
32. M. Seigneuret, J. L. Rigaud, Use of the Fluorescent Ph Probe Pyranine to Detect Heterogeneous Directions of Proton Movement in Bacteriorhodopsin Reconstituted Large Liposomes. *Febs Letters* **188**, 101-106 (1985).
33. R. Tunuguntla *et al.*, Lipid bilayer composition can influence the orientation of proteorhodopsin in artificial membranes. *Biophys J* **105**, 1388-1396 (2013).
34. S. L. Niu, B. Doctrow, D. C. Mitchell, Rhodopsin activity varies in proteoliposomes prepared by different techniques. *Biochemistry* **48**, 156-163 (2009).
35. O. V. Kolomytkin, Structure of planar membrane formed from liposomes. *Biochim Biophys Acta* **900**, 145-156 (1987).
36. B. Schobert, J. K. Lanyi, Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem* **257**, 10306-10313 (1982).
37. J. K. Lanyi, M. P. Silverman, Gating effects in Halobacterium halobium membrane transport. *J Biol Chem* **254**, 4750-4755 (1979).
38. G. Nagel, B. Mockel, G. Buldt, E. Bamberg, Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Lett* **377**, 263-266 (1995).
39. G. Nagel, B. Kelety, B. Mockel, G. Buldt, E. Bamberg, Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2. *Biophysical journal* **74**, 403-412 (1998).
40. S. Geibel *et al.*, The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior. *Biophysical journal* **81**, 2059-2068 (2001).
41. S. Geibel, E. Lorinczi, E. Bamberg, T. Friedrich, Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin mutants with altered lifetime of the M intermediate. *PLoS One* **8**, e73338 (2013).
42. S. P. Tsunoda *et al.*, H⁺ -pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*. *Biophys J* **91**, 1471-1479 (2006).
43. T. E. DeCoursey, Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. *Physiol Rev* **93**, 599-652 (2013).
44. F. Schneider, C. Grimm, P. Hegemann, Biophysics of Channelrhodopsin. *Annu Rev Biophys* **44**, 167-186 (2015).

45. D. Boeuf, S. Audic, L. Brillet-Gueguen, C. Caron, C. Jeanthon, MicRhODE: a curated database for the analysis of microbial rhodopsin diversity and evolution. *Database (Oxford)* **2015**, (2015).
46. S. A. Waschuk, A. G. Bezerra, Jr., L. Shi, L. S. Brown, Leptosphaeria rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6879-6883 (2005).
47. K. Ihara *et al.*, Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J Mol Biol* **285**, 163-174 (1999).
48. B. Y. Chow *et al.*, High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* **463**, 98-102 (2010).
49. J. Garcia-Martinez, M. Brunk, J. Avalos, U. Terpitz, The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Sci Rep* **5**, 7798 (2015).
50. A. Seki *et al.*, Heterologous expression of Pharaonis halorhodopsin in *Xenopus laevis* oocytes and electrophysiological characterization of its light-driven Cl⁻ pump activity. *Biophys J* **92**, 2559-2569 (2007).
51. K. Inoue *et al.*, A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat Commun* **4**, 1678 (2013).
52. O. Beja *et al.*, Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**, 1902-1906 (2000).
53. C. Bamann, E. Bamberg, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, Proteorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 614-625 (2014).
54. T. Friedrich *et al.*, Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality. *J Mol Biol* **321**, 821-838 (2002).
55. E. Lörinczi *et al.*, Voltage- and pH-dependent changes in vectoriality of photocurrents mediated by wild-type and mutant proteorhodopsins upon expression in *Xenopus* oocytes. *J Mol Biol* **393**, 320-341 (2009).
56. N. Pflieger *et al.*, Solid-state NMR and functional studies on proteorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 697-705 (2009).
57. W. W. Wang, O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich, J. L. Spudich, Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin. *J Biol Chem* **278**, 33985-33991 (2003).
58. A. K. Dioumaev, J. M. Wang, Z. Balint, G. Varo, J. K. Lanyi, Proton transport by proteorhodopsin requires that the retinal Schiff base counterion Asp-97 be anionic. *Biochemistry* **42**, 6582-6587 (2003).
59. M. Lakatos, J. K. Lanyi, J. Szakacs, G. Varo, The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH. *Biophysical journal* **84**, 3252-3256 (2003).
60. S. P. Balashov *et al.*, Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science* **309**, 2061-2064 (2005).
61. H. Luecke *et al.*, Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16561-16565 (2008).
62. Y. Nakamura *et al.*, Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res* **10**, 137-145 (2003).
63. M. R. Miranda *et al.*, The photocycle and proton translocation pathway in a cyanobacterial ion-pumping rhodopsin. *Biophys J* **96**, 1471-1481 (2009).
64. L. E. Petrovskaya *et al.*, Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett* **584**, 4193-4196 (2010).
65. L. E. Petrovskaya *et al.*, ESR - A Retinal Protein with Unusual Properties from *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry-Moscow* **80**, 688-700 (2015).
66. V. H. Albarracin *et al.*, Functional Green-Tuned Proteorhodopsin from Modern Stromatolites. *PLoS One* **11**, e0154962 (2016).

67. A. Harris *et al.*, A new group of eubacterial light-driven retinal-binding proton pumps with an unusual cytoplasmic proton donor. *Biochim Biophys Acta* **1847**, 1518-1529 (2015).
68. G. Blanc *et al.*, The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol* **13**, R39 (2012).
69. G. Nagel *et al.*, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398 (2002).
70. G. Nagel *et al.*, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13940-13945 (2003).
71. S. P. Tsunoda, P. Hegemann, Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochemistry and photobiology* **85**, 564-569 (2009).
72. O. A. Sineshchekov, K. H. Jung, J. L. Spudich, Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8689-8694 (2002).
73. G. Kreimer, The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr Genet* **55**, 19-43 (2009).
74. V. A. Lorenz-Fonfria, J. Heberle, Channelrhodopsin unchained: structure and mechanism of a light-gated cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 626-642 (2014).
75. E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, R. Janz, X. Liu, J. L. Spudich, NEUROSCIENCE. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science* **349**, 647-650 (2015).
76. H. E. Kato *et al.*, Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* **482**, 369-374 (2012).
77. M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci* **7**, 1381-1386 (2004).
78. B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng, G. Miesenböck, Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* **33**, 15-22 (2002).
79. X. Li *et al.*, Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17816-17821 (2005).
80. G. Nagel *et al.*, Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* **15**, 2279-2284 (2005).
81. E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**, 1263-1268 (2005).
82. F. Zhang *et al.*, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**, 633-639 (2007).
83. S. J. Husson *et al.*, Microbial light-activatable proton pumps as neuronal inhibitors to functionally dissect neuronal networks in *C. elegans*. *PLoS One* **7**, e40937 (2012).
84. M. Mahn, M. Prigge, S. Ron, R. Levy, O. Yizhar, Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals. *Nat Neurosci* **19**, 554-556 (2016).
85. M. El-Gaby *et al.*, Archaelhodopsin Selectively and Reversibly Silences Synaptic Transmission through Altered pH. *Cell Rep* **16**, 2259-2268 (2016).
86. J. M. Kralj, D. R. Hochbaum, A. D. Douglass, A. E. Cohen, Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein. *Science* **333**, 345-348 (2011).
87. J. M. Kralj, A. D. Douglass, D. R. Hochbaum, D. Maclaurin, A. E. Cohen, Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature Methods* **9**, 90-U130 (2012).
88. D. Maclaurin, V. Venkatachalam, H. Lee, A. E. Cohen, Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5939-5944 (2013).
89. D. R. Hochbaum *et al.*, All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods* **11**, 825-833 (2014).

90. S. L. Jacques, Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol* **58**, R37-61 (2013).
91. M. Prigge *et al.*, Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics. *J Biol Chem* **287**, 31804-31812 (2012).
92. S. Kleinlogel *et al.*, Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* **14**, 513-518 (2011).
93. L. A. Gunaydin *et al.*, Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* **13**, 387-392 (2010).
94. S. Ullrich, R. Gueta, G. Nagel, Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants. *Biol Chem* **394**, 271-280 (2013).
95. A. Berndt *et al.*, High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7595-7600 (2011).
96. A. Dawydow *et al.*, Channelrhodopsin-2-XXL, a powerful optogenetic tool for low-light applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13972-13977 (2014).
97. A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, K. Deisseroth, Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* **12**, 229-234 (2009).
98. N. C. Klapoetke *et al.*, Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* **11**, 338-346 (2014).
99. A. S. Chuong *et al.*, Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat Neurosci* **17**, 1123-1129 (2014).
100. S. Y. Kim, S. A. Waschuk, L. S. Brown, K. H. Jung, Screening and characterization of proteorhodopsin color-tuning mutations in *Escherichia coli* with endogenous retinal synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 504-513 (2008).
101. M. K. Engqvist *et al.*, Directed evolution of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin spectral properties. *J Mol Biol* **427**, 205-220 (2015).
102. Y. Sudo *et al.*, A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing. *J Biol Chem* **288**, 20624-20632 (2013).
103. J. Tittor *et al.*, Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: different modes of ion translocation in a retinal protein. *J Mol Biol* **271**, 405-416 (1997).
104. J. Sasaki *et al.*, Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump. *Science* **269**, 73-75 (1995).
105. M. B. Nielsen, Model systems for understanding absorption tuning by opsin proteins. *Chem Soc Rev* **38**, 913-924 (2009).
106. W. Wang, J. H. Geiger, B. Borhan, The photochemical determinants of color vision: revealing how opsins tune their chromophore's absorption wavelength. *Bioessays* **36**, 65-74 (2014).
107. L. H. Andersen *et al.*, Absorption of schiff-base retinal chromophores in vacuo. *J Am Chem Soc* **127**, 12347-12350 (2005).
108. K. Nakanishi, V. Baloghnaïr, M. Arnaboldi, K. Tsujimoto, B. Honig, An External Point-Charge Model for Bacteriorhodopsin to Account for Its Purple Color. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 7945-7947 (1980).
109. J. Rajput *et al.*, Probing and modeling the absorption of retinal protein chromophores in vacuo. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 1790-1793 (2010).
110. Y. Kito, T. Seki, T. Suzuki, I. Uchiyama, 3-Dehydroretinal in the eye of a bioluminescent squid, *Watasenia scintillans*. *Vision Res* **26**, 275-279 (1986).
111. M. Toyama *et al.*, Presence of rhodopsin and porphyropsin in the eyes of 164 fishes, representing marine, diadromous, coastal and freshwater species--a qualitative and comparative study. *Photochem Photobiol* **84**, 996-1002 (2008).
112. S. Sekharan, S. Yokoyama, K. Morokuma, Quantum mechanical/molecular mechanical structure, enantioselectivity, and spectroscopy of hydroxyretinals and insights into the evolution of color vision in small white butterflies. *J Phys Chem B* **115**, 15380-15388 (2011).
113. T. Seki *et al.*, A fly, *Drosophila melanogaster*, forms 11-cis 3-hydroxyretinal in the dark. *Vision Res* **26**, 255-258 (1986).

114. S. Matsui *et al.*, 4-Hydroxyretinal, a new visual pigment chromophore found in the bioluminescent squid, *Watasenia scintillans*. *Biochim Biophys Acta* **966**, 370-374 (1988).
115. T. Jussila, N. V. Tkachenko, S. Parkkinen, H. Lemmetyinen, Kinetics of photo-active bacteriorhodopsin analog 3,4-didehydroretinal. *J Photochem Photobiol B* **62**, 128-132 (2001).
116. L. A. Drachev *et al.*, An investigation of the electrochemical cycle of bacteriorhodopsin analogs with the modified ring. *Arch Biochem Biophys* **270**, 184-197 (1989).
117. A. Albeck, N. Friedman, M. Sheves, M. Ottolenghi, Factors affecting the absorption maxima of acidic forms of bacteriorhodopsin. A study with artificial pigments. *Biophys J* **56**, 1259-1265 (1989).
118. R. Muthyala, D. Watanabe, A. E. Asato, R. S. Liu, The nature of the delocalized cations in azulenic bacteriorhodopsin analogs. *Photochemistry and photobiology* **74**, 837-845 (2001).
119. K. W. Foster *et al.*, Activation of *Chlamydomonas* rhodopsin in vivo does not require isomerization of retinal. *Biochemistry* **28**, 819-824 (1989).
120. K. W. Foster, J. Saranak, S. Krane, R. L. Johnson, K. Nakanishi, Evidence from *Chlamydomonas* on the photoactivation of rhodopsins without isomerization of their chromophore. *Chem Biol* **18**, 733-742 (2011).
121. O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, J. Wang, J. L. Spudich, Enhancement of the long-wavelength sensitivity of optogenetic microbial rhodopsins by 3,4-dehydroretinal. *Biochemistry* **51**, 4499-4506 (2012).
122. G. Schmies, M. Engelhard, P. G. Wood, G. Nagel, E. Bamberg, Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1555-1559 (2001).
123. K. Feldbauer *et al.*, Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12317-12322 (2009).
124. S. L. Garcia *et al.*, Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME J* **7**, 137-147 (2013).
125. G. E. Shull, cDNA cloning of the beta-subunit of the rat gastric H,K-ATPase. *J Biol Chem* **265**, 12123-12126 (1990).
126. K. Inoue *et al.*, Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel. *J Am Chem Soc* **137**, 3291-3299 (2015).
127. M. F. Cicirelli, K. R. Robinson, L. D. Smith, Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev Biol* **100**, 133-146 (1983).
128. C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, E. Bamberg, Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* **375**, 686-694 (2008).
129. A. Vogt, J. Wietek, P. Hegemann, Gloeobacter rhodopsin, limitation of proton pumping at high electrochemical load. *Biophys J* **105**, 2055-2063 (2013).
130. M. Wanko, M. Hoffmann, T. Frauenheim, M. Elstner, Effect of polarization on the opsin shift in rhodopsins. 1. A combined QM/QM/MM model for bacteriorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II. *J Phys Chem B* **112**, 11462-11467 (2008).
131. A. Altun, S. Yokoyama, K. Morokuma, Quantum mechanical/molecular mechanical studies on spectral tuning mechanisms of visual pigments and other photoactive proteins. *Photochem Photobiol* **84**, 845-854 (2008).
132. V. B. Bergo *et al.*, His-75 in proteorhodopsin, a novel component in light-driven proton translocation by primary pumps. *J Biol Chem* **284**, 2836-2843 (2009).
133. F. Hempelmann *et al.*, His75-Asp97 cluster in green proteorhodopsin. *J Am Chem Soc* **133**, 4645-4654 (2011).
134. M. Azuma, T. Seki, S. Fujishita, Changes of egg retinoids during the development of *Xenopus laevis*. *Vision research* **30**, 1395-1400 (1990).
135. C. D. Bridges, J. G. Hollyfield, P. Witkovsky, E. Gallin, The visual pigment and vitamin A of *Xenopus laevis* embryos, larvae and adults. *Exp Eye Res* **24**, 7-13 (1977).
136. H. Otto *et al.*, Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9228-9232 (1989).

137. M. Holz *et al.*, Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2167-2171 (1989).
138. L. Zimanyi *et al.*, Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* **31**, 8535-8543 (1992).
139. L. S. Brown *et al.*, Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin. *J Biol Chem* **270**, 27122-27126 (1995).
140. A. K. Dioumaev *et al.*, Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry* **37**, 2496-2506 (1998).
141. T. Lazarova, C. Sanz, E. Querol, E. Padros, Fourier transform infrared evidence for early deprotonation of Asp(85) at alkaline pH in the photocycle of bacteriorhodopsin mutants containing E194Q. *Biophys J* **78**, 2022-2030 (2000).
142. C. Zscherp, R. Schlesinger, J. Heberle, Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin. *Biochemical and biophysical research communications* **283**, 57-63 (2001).
143. M. Nack *et al.*, The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochem Photobiol Sci* **9**, 194-198 (2010).
144. P. Berthold *et al.*, Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *The Plant cell* **20**, 1665-1677 (2008).
145. W. Weber, Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* **1421**, 213-233 (1999).
146. A. P. Plazzo *et al.*, Bioinformatic and mutational analysis of channelrhodopsin-2 protein cation-conducting pathway. *J Biol Chem* **287**, 4818-4825 (2012).
147. A. Berndt, Mechanismus und anwendungsbezogene Optimierung von Channelrhodopsin-2. *Humboldt-Universität zu Berlin*, doctoral thesis (2011).
148. J. Wietek *et al.*, Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel. *Science* **344**, 409-412 (2014).
149. E. Z. Szuts, F. I. Harosi, Solubility of retinoids in water. *Arch Biochem Biophys* **287**, 297-304 (1991).
150. T. J. Jones, R. M. Hough, W. T. Gerard, Vitamin A Studies in the Dairy Calf. *Can Vet J* **3**, 248-256 (1962).
151. M. Muenzner *et al.*, Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor alpha activity. *Mol Cell Biol* **33**, 4068-4082 (2013).
152. S. P. Balashov *et al.*, Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J Biol Chem* **288**, 21254-21265 (2013).
153. I. Gushchin *et al.*, Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12631-12636 (2013).
154. A. R. Choi, L. Shi, L. S. Brown, K. H. Jung, Cyanobacterial light-driven proton pump, *Gloeobacter* rhodopsin: complementarity between rhodopsin-based energy production and photosynthesis. *PLoS One* **9**, e110643 (2014).
155. E. A. Ferenczi *et al.*, Optogenetic approaches addressing extracellular modulation of neural excitability. *Sci Rep* **6**, 23947 (2016).
156. J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, E. Bamberg, Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys J* **67**, 1682-1690 (1994).
157. H. Otto *et al.*, Substitution of amino acids Asp-85, Asp-212, and Arg-82 in bacteriorhodopsin affects the proton release phase of the pump and the pK of the Schiff base. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1018-1022 (1990).

158. J. Tittor, D. Oesterhelt, E. Bamberg, Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps. *Biophysical chemistry* **56**, 153-157 (1995).
159. C. Scharnagl, S. F. Fischer, Conformational flexibility of arginine-82 as source for the heterogeneous and pH-dependent kinetics of the primary proton transfer step in the bacteriorhodopsin photocycle: An electrostatic model. *Chem Phys* **212**, 231-246 (1996).
160. M. S. Hutson, U. Alexiev, S. V. Shilov, K. J. Wise, M. S. Braiman, Evidence for a perturbation of arginine-82 in the bacteriorhodopsin photocycle from time-resolved infrared spectra. *Biochemistry* **39**, 13189-13200 (2000).
161. T. Tanimoto, M. Shibata, M. Belenky, J. Herzfeld, H. Kandori, Altered hydrogen bonding of Arg82 during the proton pump cycle of bacteriorhodopsin: a low-temperature polarized FTIR spectroscopic study. *Biochemistry* **43**, 9439-9447 (2004).
162. L. J. Miercke *et al.*, Wild-type and mutant bacteriorhodopsins D85N, D96N, and R82Q: purification to homogeneity, pH dependence of pumping, and electron diffraction. *Biochemistry* **30**, 3088-3098 (1991).
163. S. Misra, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick, Charge movements in the 13-cis photocycles of the bacteriorhodopsin mutants R82K and R82Q. *Photochem Photobiol* **65**, 1039-1044 (1997).
164. L. J. Stern, H. G. Khorana, Structure-function studies on bacteriorhodopsin. X. Individual substitutions of arginine residues by glutamine affect chromophore formation, photocycle, and proton translocation. *J Biol Chem* **264**, 14202-14208 (1989).
165. E. G. Govorunova, O. A. Sineshchikov, J. L. Spudich, Structurally Distinct Cation Channelrhodopsins from Cryptophyte Algae. *Biophys J* **110**, 2302-2304 (2016).
166. R. Govindjic *et al.*, Effects of substitution of tyrosine 57 with asparagine and phenylalanine on the properties of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 4828-4838 (1995).
167. T. Ran *et al.*, Cross-protomer interaction with the photoactive site in oligomeric proteorhodopsin complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1965-1980 (2013).
168. T. Tsukamoto *et al.*, Salt bridge in the conserved His-Asp cluster in Gloeobacter rhodopsin contributes to trimer formation. *FEBS Lett* **587**, 322-327 (2013).
169. S. Hussain, M. Kinnebrew, N. S. Schonenbach, E. Aye, S. Han, Functional consequences of the oligomeric assembly of proteorhodopsin. *J Mol Biol* **427**, 1278-1290 (2015).
170. K. Stehfest, E. Ritter, A. Berndt, F. Bartl, P. Hegemann, The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J Mol Biol* **398**, 690-702 (2010).
171. C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel, E. Bamberg, Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* **49**, 267-278 (2010).
172. V. A. Lorenz-Fonfria *et al.*, Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E1273-1281 (2013).
173. Y. Cao, L. S. Brown, R. Needleman, J. K. Lanyi, Relationship of proton uptake on the cytoplasmic surface and reisomerization of the retinal in the bacteriorhodopsin photocycle: an attempt to understand the complex kinetics of the pH changes and the N and O intermediates. *Biochemistry* **32**, 10239-10248 (1993).
174. J. Tamogami *et al.*, Formation of M-Like Intermediates in Proteorhodopsin in Alkali Solutions (pH \geq approximately 8.5) Where the Proton Release Occurs First in Contrast to the Sequence at Lower pH. *Biochemistry* **55**, 1036-1048 (2016).
175. A. Vogt *et al.*, Conversion of a light-driven proton pump into a light-gated ion channel. *Sci Rep* **5**, 16450 (2015).
176. R. Hagedorn, D. Gradmann, P. Hegemann, Dynamics of voltage profile in enzymatic ion transporters, demonstrated in electrokinetics of proton pumping rhodopsin. *Biophys J* **95**, 5005-5013 (2008).
177. O. Rollman, E. J. Wood, M. J. Olsson, W. J. Cunliffe, Biosynthesis of 3,4-didehydroretinol from retinol by human skin keratinocytes in culture. *Biochem J* **293** (Pt 3), 675-682 (1993).

- 178. D. Oesterhelt, P. Hegemann, J. Tittor, The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. II: Quantum yields and a kinetic model. *EMBO J* **4**, 2351-2356 (1985).
- 179. R. Govindjee, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. *Biophys J* **58**, 597-608 (1990).
- 180. R. Rippka, J. Waterbury, G. Cohen-Bazire, A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Archives of Microbiology* **100**, 419-436 (1974).
- 181. C. H. Slamovits, N. Okamoto, L. Burri, E. R. James, P. J. Keeling, A bacterial proteorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. *Nat Commun* **2**, 183 (2011).
- 182. D. Nguyen *et al.*, Winter diversity and expression of proteorhodopsin genes in a polar ocean. *ISME J* **9**, 1835-1845 (2015).
- 183. J. A. Fuhrman, M. S. Schwalbach, U. Stingl, Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol* **6**, 488-494 (2008).
- 184. L. Gomez-Consarnau *et al.*, Proteorhodopsin light-enhanced growth linked to vitamin-B1 acquisition in marine Flavobacteria. *ISME J* **10**, 1102-1112 (2016).
- 185. T. M. Kuniyoshi, A. Balan, A. C. Schenberg, D. Severino, P. C. Hallenbeck, Heterologous expression of proteorhodopsin enhances H₂ production in Escherichia coli when endogenous Hyd-4 is overexpressed. *J Biotechnol* **206**, 52-57 (2015).
- 186. B. R. Rost *et al.*, Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nat Neurosci* **18**, 1845-1852 (2015).
- 187. S. Kleinlogel *et al.*, A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins. *Nat Methods* **8**, 1083-1088 (2011).
- 188. E. R. Liman, J. Tytgat, P. Hess, Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861-871 (1992).
- 189. A. Leduc-Nadeau, K. Lahjouji, P. Bissonnette, J. Y. Lapointe, D. G. Bichet, Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from Xenopus laevis oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1132-1136 (2007).

7 Konferenz- und Seminarbeiträge

- (1) Arend Vogt, Peter Hegemann
"Conversion of light-driven proton pumps into light-gated proton channels"
 International Workshop Proton and Proton-coupled Transport, Berlin, 2016, *Vortrag*
- (2) Arend Vogt, Christiane Grimm, Peter Hegemann
"The diversity of light-driven ion pumps and their conversion into ion channels"
 Biophysical Society 60th Annual Meeting, Los Angeles (USA), 2016, *Poster*
- (3) Arend Vogt, Peter Hegemann
"Conversion of light-driven pumps into light-gated channels"
 DFG-Rundgespräch Photoreceptors & FOR1279 Meeting, Frauenchiemsee, 2015, *Vortrag*
- (4) Arend Vogt, Peter Hegemann
"The diversity of light-driven proton pumps and their conversion into proton channels"
 40th FEBS Congress, Berlin, 2015, *Poster*
- (5) Arend Vogt, Peter Hegemann
"The diversity of light-driven proton pumps and their conversion into proton channels"
 47th Sandbjerg Meeting on Membrane Transport, Sønderborg (Dänemark), 2015, *Vortrag*
- (6) Arend Vogt, Peeyush Ranjan, Suneel Kateriya, Satoshi Tsunoda, Peter Hegemann
"Conversion of proton pumps into light-gated proton channels"
 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama (Japan), 2014, *Poster*
- (7) Arend Vogt, Peter Hegemann
"Conversion of proton pumps into light-gated proton channels"
 FOR1279 Meeting, Würzburg, 2014, *Vortrag*
- (8) Arend Vogt, Jonas Wietek, Peter Hegemann
"Limitation of light driven proton pumps at high electrochemical load"
 Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco (USA), 2014, *Poster*
- (9) Arend Vogt, Jonas Wietek, Peter Hegemann
"Light driven proton pumps: What is the limitation of directed transport?"
 Molecular Life Sciences- International Symposium of the GBM, Frankfurt a.M., 2013, *Poster*
- (10) Arend Vogt, Jana Liewald, Karen Erbguth, Negin AzimiHashemi, David Woodmansee,
 Dirk Trauner, Alexander Gottschalk, Peter Hegemann.
"Spectral tuning of rhodopsins using retinal analogs"
 FOR1279 Meeting, Heidelberg, 2013, *Vortrag*
- (11) Arend Vogt, Dirk Trauner, Peter Hegemann
"Channelrhodopsin Color tuning"
 Begutachtung des FOR1279, Berlin, 2013, *Poster*
- (12) Arend Vogt, Kyoko Tsunoda, Satoshi Tsunoda, Sonja Minniberger, Peter Hegemann
"A new eucaryotic proton pump and its application to optogenetics"
 FOR1279 Meeting, Würzburg, 2012, *Vortrag*
- (13) Arend Vogt, Jonas Wietek, Peter Hegemann
"The Slippage of a Light Driven Proton Pump"

15th International Conference on Retinal Proteins, Ascona (Schweiz), 2012, *Poster*

8 Danksagung

Diese Arbeit wäre selbstverständlich nicht ohne die Unterstützung vieler Menschen möglich gewesen, welche auf vielfältige Art und Weise produktiv mitgewirkt haben.

Zu allererst will ich meinem Hauptbetreuer Prof. Peter Hegemann dafür danken, dass er mir die Möglichkeit, Betreuung, Förderung und das Vertrauen gegeben hat mich in seinem Labor und Umfeld wissenschaftlich weiterentwickeln zu können. In diesem Zusammenhang gilt auch ein großer Dank an Prof. Thomas Friedrich und Prof. Franz Bartl für die Bereitschaft diese Doktorarbeit zu begutachten. Hierbei ist auch die hilfreiche Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Friedrich in Zusammenhang mit Proteorhodopsin und den Oozyten zu erwähnen. Des Weiteren will ich auch Prof. Bernd Reif für die Beratung und Leitung der „*Leibniz Graduate School of Molecular Biophysics*“ danken.

Aus dem Labor ist besonders die Hilfe von Maila Reh, Dr. Franziska Schneider, Dr. Matthias Prigge und Dr. Satoshi Tsunoda zu loben. Neben hilfreichen Tipps und Diskussionen haben sie mir auch die Grundlagen der Elektrophysiologie beigebracht. Insbesondere Dr. Satoshi Tsunoda habe ich sowohl auf wissenschaftlicher als auch auf praktischer Ebene im Labor viel zu verdanken. Natürlich ist auch die Unterstützung durch Margrit Michalsky im Laboralltag und durch Altina Klein in der Zellkultur zu erwähnen. Wissenschaftliche Diskussionen mit Johannes Vierock unterstützten mich ebenfalls, welche auch zu neuen Inspirationen, Ansichten und zu der finalen Entscheidung für den Titel nach der Fertigstellung der schriftlichen Arbeit führten.

Einen besonderen Dank hat auch Jonas Wietek verdient. Er hat mich tatkräftig mit seiner Masterarbeit bei der Untersuchung des *Gloeobacter*-Rhodopsins unterstützt. Dies führte letztendlich auch zu der gemeinsamen Publikation. Darüber hinaus sind sein technisches Interesse und die daraus resultierenden Fähigkeiten nicht nur für mich sehr hilfreich gewesen. Ich danke ebenfalls den Studenten Annabell Marlen Hillenbrand und Maximiliano Ancina Möller, welche mich durch ihre Projektmodule über Retinal-Analoga beziehungsweise mit der Untersuchung neuer Ionenpumpen unterstützten. Zudem möchte ich mich bei Dr. Jana F. Liewald, Prof. Alexander Gottschalk, Dr. David Woodmansee und Prof. Dirk Trauner und weiteren Kooperationspartnern aus dem Retinal-Analoga-Projekt für die produktive Zusammenarbeit danken. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Prof. Andreas Herrmann und Dr. Thomas Korte für ihre Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie bedanken.

Natürlich danke ich auch meinen Eltern, Verwandten und meinem Freund Holger Sieg sowohl für ihre generelle Unterstützung als auch für die Bereitschaft zu akzeptieren, dass das Arbeiten im Wissenschaftsbetrieb sich in einigen Strukturen und Anforderungen im Vergleich zu anderen Beschäftigungsfeldern unterscheiden kann.

Selbstverständlich ist auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR1279) und der Leibniz-Gemeinschaft (*Graduate School*) für die finanzielle Förderung zu danken.

9 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Elektrophysiologische Untersuchung des gerichteten Protonentransportes in mikrobiellen Rhodopsinen“ selbständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den _____

Arend Vogt